

Přístupy ke studiu mikrobiální diverzity potravin

Ondřej Holas

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ondřej Holas**
Osobní číslo: **T12241**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Přístupy ke studiu mikrobiální diverzity potravin**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte přehled přístupů a konkrétních metod, které se využívají ke studiu mikrobiální diverzity daného prostředí (kultivačně závislé a nezávislé metody)
2. Popište studium mikrobiální diverzity potravin (rostlinného a živočišného původu)

II. Praktická část

1. Izolujte DNA ze vzorků jedlého hmyzu, příp. dalších potravin
2. ARDRA (PCR-RFLP) analýza
3. PCR-TGGE analýza

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] ERCOLINI, Danilo. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, vol. 56, issue 3, s. 297-314. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770120300321X>
- [2] GIRAFFA, Giorgio a Erasmo NEVIANI. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 67, 1-2, s. 19-34. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00445-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501004457>
- [3] JUSTE, A, B THOMMA a B LIEVENS. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, issue 6, s. 745-761. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008000786>
- [4] QUIGLEY, Lisa, Orla O'SULLIVAN, Tom P. BERESFORD, R. Paul ROSS, Gerald F. FITZGERALD a Paul D. COTTER. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, vol. 150, 2-3, s. 81-94. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511004454>
- [5] RANTSIOU, Kalliopi a Luca COCOLIN. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, vol. 108, issue 2, s. 255-267. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160506000201>

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

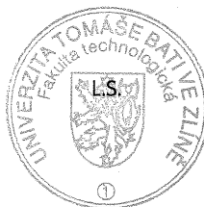
2. února 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 2015

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HOLAS ONDŘEJ

Obor: CKTA

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 4.5.2015


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce požítovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní díla:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k větší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V přírodě vytváří mikroorganismy mikrobiální společenstva, jejichž diverzita je typická druhovou bohatostí a relativním zastoupením druhů. Cílem bakalářské práce bylo popsat metody, které lze použít ke studiu mikrobiální diverzity potravin. V současnosti se stále více využívají metody bez potřeby kultivace. Mikrobiální diverzita potravin rostlinného a živočišného původu se zásadně odlišuje. V praktické části byla zkoumána mikroflóra jedlého hmyzu a jedlého květu. Pro stanovení mikrobiální diverzity byly použity molekulární metody ARDRA a TGGE. Ve vzorcích jedlého hmyzu byla prokázána velká mikrobiální rozmanitost, zatímco jedlý květ měl mikroflóru znatelně chudší.

Klíčová slova: ARDRA, TGGE, jedlý hmyz, jedlý květ, mikrobiální diverzita

ABSTRACT

Microorganisms in nature create microbial communities, whose diversity is typical of the species richness and relative abundance of species. The aim of the thesis was to describe the methods that can be used to study microbial diversity of food. Currently, non-cultivation methods are increasingly used. Microbial diversity of foods of plant and animal origin are fundamentally different. In the practical part microflora of edible insects and edible flower was examined. Molecular methods ARDRA and TGGE were used to determine the microbial diversity. Varied microbial diversity was demonstrated in samples of the edible insects, while edible flower flora was significantly poorer.

Keywords: ARDRA, TGGE, edible insect, edible flowers, microbial diversity

Touto cestou bych chtěl poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Magdě Doležalové, PhD. za odborné vedení, rady, připomínky a velkou trpělivost. Bc. Veronice Kučabové za pomoc při praktické části bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 METODY STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY	12
1.1 KULTIVAČNĚ ZÁVISLÉ METODY.....	12
1.1.1 CPM.....	12
1.1.2 MPN.....	12
1.1.3 Kultivačně závislé molekulární metody.....	12
1.2 KULTIVAČNĚ NEZÁVISLÉ METODY.....	13
1.3 FINGERPRINT METODY.....	13
1.3.1 DGGE/TGGE.....	13
1.3.2 PCR.....	14
1.3.3 T-RFLP.....	15
1.3.4 ARDRA (PCR-RFLP).....	16
2 MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA	17
2.1 FERMENTOVANÉ MASNÉ VÝROBKY.....	17
2.2 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY.....	18
2.3 VÍNO A HROZNOVÉ VÍNO.....	19
2.4 STOLNÍ OLIVY.....	19
2.5 JEDLÝ HMYZ.....	19
2.6 JEDLÉ KVĚTY.....	20
II PRAKTICKÁ ČÁST	21
3 CÍLE PRÁCE	22
4 MATERIÁL	23
4.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ.....	23
4.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	23
4.3 CHEMIKÁLIE.....	23
5 METODY	26
5.1 IZOLACE DNA.....	26
5.2 PCR.....	26
5.3 AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	27
5.4 ARDRA.....	27
5.5 TGGE.....	27
5.5.1 Nested PCR.....	27
5.5.2 Příprava aparatury pro TGGE.....	30
5.5.3 Příprava gelu pro TGGE.....	30
5.5.4 TGGE.....	30
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
6.1 IZOLACE DNA.....	32
6.2 ARDRA.....	33
6.2.1 <i>Hae</i> III.....	35
6.2.2 <i>EcoR</i> I.....	35

6.2.3	<i>Hind</i> III.....	35
6.2.4	<i>Xho</i> I.....	35
6.2.5	<i>Hinf</i> I.....	36
6.2.6	<i>Hae</i> III + <i>Hinf</i> I.....	36
6.3	TGGE.....	36
ZÁVĚR.....		41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		42
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		47
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		48
SEZNAM TABULEK.....		49

ÚVOD

Význam sledování mikrobiální biodiverzity spočívá v tom, že mnoho mikroorganismů, které jsou přítomny v potravinách, ovlivňují výsledný charakter dané potraviny. Vliv na potravinu může být pozitivní jako je zlepšení sensorických vlastností potraviny nebo zlepšení stravitelnosti. Negativně ovlivněné potraviny jsou potraviny znehodnocené hnilobou nebo přítomností mikrobiální vady. V rámci zlepšení kvality a bezpečnosti potravin, bude kladen stále větší důraz na mikrobiální diverzitu přítomnou v potravinách. Přesné a rychlé metody jsou proto nezbytné.

Stanovení mikrobiální diverzity může být provedena použitím tradičních kultivačních metod. Kultivační metody jsou časově zdlouhavé, pracné a jejich provedení vyžaduje mnoho času. Použitím kultivačně nezávislých metod pro stanovení mikrobiální diverzity výrazně zkrátíme dobu potřebnou pro stanovení z několika dnů na několik hodin. Kromě rychlosti je použitím nekultivačních metod také velmi zvýšena citlivost a specifita. Mezi používané nekultivační metody patří metody molekulární biologie: T-RFLP, ARDRA, TGGE, PCR, qPCR, hybridizační metody a mnohé další.

Kultivačně nezávislé metody se stávají vhodnou alternativou k tradičním kultivačním metodám a je tendence kultivační metody nahrazovat.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 METODY STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY

1.1 Kultivačně závislé metody

Klasické mikrobiologické metody mají velký význam při studiu mikroorganismů. Kultivačně závislé metody jsou založeny na růstu bakterií na uměle vyrobených živných půdách [1]. Tyto půdy se podobají podmínkám prostředí, ze kterého jsou mikroorganismy získány. Tradiční metodou pro stanovení mikrobiální diverzity je plotnová metoda, pomocí které se kultivují životaschopné buňky [2].

1.1.1 CPM

Plotnová metoda neboli metoda celkového počtu mikroorganismů (CPM) je metoda, kde jsou mikroorganismy kultivovány na neselektivních pevných živných půdách. Podle morfologických a mikroskopických znaků jsou popsány, jako tvar velikost kolonií, vlastnosti buněčné stěny u bakterií (G^+ a G^-) nebo tvorba spor. Biochemickou identifikací jednotlivých kolonií jsou bakterie dále tříděny do čeledí a rodů [3].

1.1.2 MPN

Metodu pravděpodobného počtu (MPN) používáme u vzorků, které se kultivují na tekutých živných půdách a nárůst mikroorganismů se projevuje zákalem, sedimentem, povrchovou blankou nebo tvorbou plynu. V půdách, které obsahují indikátory, se charakteristicky mění i zabarvení půdy. Pomocí zkumavkových metod nelze získat přesný přehled o mikrobiálním společenstvu, protože získáme jen mikroorganismy, které jsou kultivovatelné v tekutých živných půdách [3].

1.1.3 Kultivačně závislé molekulární metody

U kultivačně závislých metod s aplikovanými molekulárními metodami se využívá kultivace na pevných živných půdách s následnou molekulární identifikací jednotlivých kolonií. Mikroorganismy jsou kultivovány na kolektivních živných půdách, bez přidavku selektivních činidel. Pro zjištění technologicky důležitých mikroorganismů se, ale často využívají selektivní půdy, které jsou pro tyto mikroorganismy nejvhodnější. Například bakterie mléčného kvašení jsou napřed kultivovány na MRS nebo M17 agaru a následně jsou rozděleny pomocí molekulárních metod: polymorfismus terminálních restrikčních fragmentů (T-RFLP), gelová elektroforéza v teplotním gradientu (TGGE), restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA (ARDRA) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH) [4].

1.2 Kultivačně nezávislé metody

Metody používané v molekulární biologii využívají technologii amplifikace nukleových kyselin *in vitro*. Amplifikací výrazně zvýšíme citlivost detekce i při zachování vysoké specifity této reakce. Amplikony (produkty reakce) mohou být stanoveny různými technikami, které zahrnují analýzu štěpných fragmentů vzniklých působením restričních enzymů, přímou analýzou sekvencí nebo rozděleny denaturační gelovou elektroforézou (DGGE). Na rozdíl od tradičních mikrobiologických metod není k identifikaci potřebná zdlouhavá kultivace mikroorganismů [5]. Mezi základní molekulární techniky můžeme zařadit polymerázovou řetězovou reakci (PCR), TGGE a polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) [6].

Kultivačně nezávislé přístupy jsou stále více využívány pro určení složení mikrobiálních společenstev. Tyto přístupy umožnily současně charakterizovat celý ekosystém a identifikovat mnoho druhů z těchto souborů. Posun od kultivačně závislých na kultivačně nezávislé vedl k revoluci v mikrobiologii. Tyto techniky poskytují větší citlivost a rychlost stanovení oproti kultivačně závislým, s velkým pozitivem v detekci mikroorganismů, které se obtížně kultivují nebo jsou nekultivovatelné. Přes mnoho výhod kultivačně nezávislých metod, jsou stále nějaká omezení, se kterými je nutno počítat [7].

1.3 Fingerprint metody

Jedná se o metody zaměřené na sledování a vývoj změn mikrobiální populace molekulárními metodami v potravinách. Hlavním důvodem použití fingerprint metod je neznalost optimálních podmínek pro kultivaci mikroorganismů. Molekulární metody jsou schopny analyzovat i velmi malé množství materiálu a není důležité, zda se jedná o živou nebo mrtvou buňku [8]. Fingerprint metody jsou schopné poskytnout celkový profil představující genetickou rozmanitost mikrobiální populace v konkrétním prostředí. DGGE/TGGE je nejvíce využívaná metoda pro svou univerzálnost a pro schopnost posouzení struktury mikrobiální komunity [9].

1.3.1 DGGE/TGGE

DGGE i TGGE zkoumá mikrobiální rozmanitost na základě nukleotidové struktury. Nejdříve jsou amplifikovány malé PCR fragmenty nukleových kyselin (200-700 bp) a na akrylamidovém gelu s rostoucím denaturačním gradientem jsou následně rozděleny podle rozdílné mobility u částečně denaturované DNA a nedenaturované DNA [10].

DGGE používá k denaturaci chemické látky jako např. formamid a močovinu. TGGE k denaturaci používá teplotní gradient. Výsledkem jsou fragmenty DNA podobné délky, ale s rozdílnými sekvencemi. Obecně platí, že chování při denaturaci závisí na délce produktu a množství guanin-cytosin párů, které jsou více stabilní v denaturačním gradientu než pár adenin-tymin. Zpočátku je denaturace částečná, a z denaturovaných oblastí se stávají dvě jednořetězcové části, tímto se snižuje pohyblivost fragmentu v gelu. Nakonec je řetězec úplně rozdělen, až na GC svorku (40-45 bází bohatých na GC páry) [8]. Tato svorka je velmi stabilní a drží dvoušroubovicovou molekulu pohromadě, migrace molekuly v elektrickém poli je tím výrazně zpomalena nebo zastavena. DGGE profily DNA odvozené z PCR produktů jsou generovány pro popisování metabolicky aktivních populací. Hlavní výhodou DGGE a TGGE je jejich dostupnost pro molekulární laboratoře a relativně snadná interpretace výsledků. Jednotlivé bandy mohou být vyříznuty z gelu a identifikovány sekvencováním. Sekvencování ale mohou bránit malé fragmenty PCR produktů, které nemusí obsahovat dostatečné informace pro taxonomickou klasifikaci. Je nutné upozornit na to, že různé amplikony mohou mít stejnou elektroforetickou pohyblivost, což má za následek společnou migraci s různými fragmenty. Nevýhoda, která je často spojována s DGGE/TGGE, je špatná reprodukovatelnost. Ta se však může zvětšit začleněním vnitřních standardů a normalizace vzorků [11].

1.3.2 PCR

PCR je metoda, kterou zavedl Kary B. Mullis v roce 1986 [12]. Zavedení PCR mělo pro molekulární biologii stejný význam, jako objevení restrikčních endonukleáz nebo sekvencování DNA [10]. Podstatou PCR je cyklické opakování enzymatické syntézy nových řetězců vybraného úseku DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ za použití DNA polymerázy [12].

PCR je založena na zmnožení (amplifikaci) genu nebo jeho části (nejčastěji úsek v oblasti 16S rRNA u bakterií). Jedná se o exponenciální reakci, kdy v závislosti na počtu matic vždy vzniká dvojnásobek, zjednodušeně to můžeme napsat jako 2^n , kdy n odpovídá počtu cyklů. Celou řetězovou reakci je možné popsat ve třech stupních, odehrávajících se v termocykleru, přístroj, který dokáže velmi rychle a přesně měnit teplotu reakčního prostředí (až 1°C za 1 sekundu) [13]. Pro správné provedení procesů denaturace, annealingu a extenze genu je potřeba specifických teplot a opakováním cyklu se spouští vždy nová řetězová reakce. Celý program končí polymerací (extenzí) a zchlazením reakční směsi [10].

Hlavní výhodou PCR je vysoká citlivost. Amplifikace DNA je plně automatizována a do hodiny může proběhnout až 30 cyklů. Teoreticky lze získat až 10^9 krát více původní matrice vzorku, v praxi je efektivita cyklu nižší než 100% a získá se kolem 10^6 až 10^8 násobku původní matrice [10].

Kvantitativní real-time PCR (qPCR) je jednou z modifikací klasické PCR. Umožňuje vysokou přesnost, specifčnost, rychlou detekci a kvantifikaci úseku DNA nebo RNA. Real-time PCR je založena na sledování průběhu reakce přímo během reakce pomocí fluorescenčních barviv a sond, které detekují množství PCR produktu zvýšením fluorescenční aktivity. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo nebo nepřímo úměrná množství amplikonů, které jsou přítomny v reakční směsi [14]. Kvantifikace se provádí matematickou analýzou amplifikačních křivek. Klasická amplifikační křivka vzniká vynesemím závislosti fluorescence na pořadovém čísle příslušného cyklu. Typická amplifikační křivka má zakřivený esovitý tvar a lze ji rozdělit na 3 úseky: 1) background fázi, kde je PCR produktu tak málo, že fluorescence je v neměřitelných hodnotách; 2) exponenciální fázi, kdy množství PCR produktu exponenciálně roste; 3) plató fáze, kde již nedochází k nárůstu PCR produktu a fluorescenční signál zůstává konstantní [15].

Detekční systémy pro qPCR využívají reakci PCR produktu s interakčními barvivou (ethidium bromid, SYBR Green I), jejichž fluorescenční aktivita vzroste po vazbě na dvouřetězcovou DNA. Jelikož během PCR vzniká dvouřetězcový produkt, který výrazně převyšuje počáteční množství dsDNA, lze sledovat pomocí interkalačních barviv průběh reakce. Nevýhodou detekčních barviv je, že detekují veškerou dsDNA, která je přítomna v reakční směsi včetně nespecifických produktů amplifikace jako primer-dimer artefakty. Nejlepším řešením pro detekci jsou oligonukleotidové sondy, které hybridizují s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu. Po navázání se výrazně zvýší fluorescenční aktivita sond. Výhodou oligonukleotidových sond je jejich vysoká specifita k cílové sekvenci [15].

1.3.3 T-RFLP

Polymorfismus terminálních restrikčních fragmentů (T-RFLP) je používána pro studium složité mikrobiální komunity na základě variability 16S rRNA. Technika T-RFLP posuzuje rozmanitost komplexních společenstev bez nutnosti znalosti jakékoliv informace o sekvencích genů. Touto metodou jsou získány informace o celém bakteriálním společenstvu v daném vzorku [10].

Restrikční endonukleázy neboli restriktázy jsou sekvenčně specifické nukleázy, které jsou produkovány bakteriemi. V buňce jsou přítomny za účelem štěpit cizorodou DNA, která se do bakteriální buňky dostává při infekci bakteriofágem. Restrikční enzymy jsou označovány podle bakterie, ze které byly izolovány. Rozpoznávací místo restrikčních endonukleáz je místo, které je tvořeno nukleotidovou sekvencí o délce 4 až 8 nukleotidů. Každá restriktáza rozpoznává specifickou sekvenci a v restrikčním místě dochází k hydrolýze fosfodiesterových vazeb [10]. Výběrem vhodných restrikčních enzymů, můžeme zvýšit pravděpodobnost, že výsledná sada restrikčních fragmentů, rozdělená podle velikosti, bude více odrážet přirozenou mikrobiální diverzitu ve vzorku. [16]

Identifikace bakterií pomocí T-RFLP je založena na analýze velikosti fragmentů získaných po štěpení amplifikovaného genu. Je velmi důležité, že jeden značený fragment vyrobený pomocí PCR a rozštěpený restrikčními enzymy odpovídá jen jedinému úseku [17].

1.3.4 ARDRA (PCR-RFLP)

ARDRA je jednoduchá technika, založená na restrikci amplifikované DNA s následným rozdělením pomocí gelové elektroforézy. Výsledky z gelové elektroforézy jsou využity k mikrobiální identifikaci nebo ke srovnání mikrobiálních společenstev. Na rozdíl od T-RFLP jsou detekovány všechny štěpné fragmenty. Nicméně s velkým množstvím fragmentů se zvyšuje i složitost, což ztěžuje interpretaci a srovnávání výsledků. Jeden restrikční enzym neposkytuje dostatečně velké rozlišení, a proto je nutné využít více restrikčních enzymů samostatně nebo je kombinovat. Nevýhodou je barvení v gelech, protože dochází k potlačení bandů od méně početné populace [11].

2 MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA

Biologickou rozmanitost můžeme definovat jako škálu rozdílných druhů organismů a jejich relativní hojnost na určitém úseku. Mikrobiální diverzita jednoznačně poukazuje na rozmanitost ve třech úrovních: v rámci druhu (genetická), počtu druhů (druhová) a komunity (ekologická rozmanitost). Termín druhová diverzita se skládá ze dvou částí, první částí je celkový počet přítomných druhů, které mohou představovat druhovou bohatost komunity. Vztahuje se tedy ke kvantitativním mezidruhovým variacím. Druhou částí je distribuce jednotlivců mezi těmito druhy, která se označuje jako rovnost nebo vyrovnanost [18]. Jedním z problémů ale je, že rovnost v bakteriálních systémech zatím není známa, protože jednotlivé buňky jsou velice zřídka identifikovány až na úroveň kmenu. Vhodným měřením pro zjištění biologické rozmanitosti je využití rozdílů v molekulárních znacích, zejména v procentu homologie deoxynukleotidových kyselin. V minulosti se diverzita určovala na základě taxonomických znaků, které nepodávaly informace o genetické rozmanitosti vzorku [2].

Znalost složení mikrobiálních společenstev, které jsou zastoupeny v potravinách, je důležité z hlediska údržnosti potravin. Tradičně se pro výskyt mikroorganismů z prostředí nebo výrobního procesu využívají metody založené na bázi kultivace. Tím jsou z mikrobiální kontroly vyloučeny ty mikroorganismy, kterým nevyhovují dané kultivační podmínky [19]. Dnes se stále více využívá pro charakterizaci mikrobiální diverzity molekulární techniky, protože poskytují poměrně obsáhlý popis dané komunity. Tyto techniky jsou velmi vhodné pro porovnávání složení mikrobiálních komunit v potravinách. Nejčastěji se využívají techniky TGGE, T-RFLP a ARDRA [11].

2.1 Fermentované masné výrobky

Za posledních 20 let se studiem mikroflóry fermentovaných masných výrobků, za použití kultivačních technik, zabývali různí autoři. Někteří se zabývali jen technologicky významnými mikroorganismy, jako jsou laktobacily a stafylokoky [20]. Jiné studie se zabývaly profilováním změn v mikrobiální populaci během fermentace a zrání výrobků. Bakterie rodu *Lactobacillus* spolu s aerobními mikroorganismy nejrychleji narůstal počet v průběhu výroby masných výrobků. Během tří dnů fermentace narostl počet mikroorganismů z 10^3 KTJ/g až na 10^8 KTJ/g, a to jak v jádru výrobku, tak i ve vnějších vrstvách výrobku. Rychlý nárůst v prvních dnech fermentace vykazují i mikroorganismy rodu *Staphylococcus*. V některých případech, kdy dojde k příliš rychlému okyselení hmoty výrobku z důvodů

rychlého nárůstu laktobacilů, tak dochází k pomalejšímu nárůstu stafylokoků. Počty laktobacilů a stafylokoků jsou však důležité na konci období zrání. Kvasinkové kultury se využívají jen u některých druhů italských fermentovaných masných výrobků typu Naples [21]. V těchto druzích tvoří kvasinky rodu *Debaryomyces* převládající mikroflóru spolu s laktobacily a stafylokoky. Kontaminující mikroflóra rodu *Enterococcus* a druhu *Escherichia coli* byly přítomny jen v prvních dnech fermentace a jejich počty se snižují. Fermentované salámy jsou obvykle prosté klostridií a koaguláza pozitivních stafylokoků. Obecně platí, že některé patogeny způsobující alimentární onemocnění mohou kontaminovat masné výrobky před fermentací, ale na konci fermentace, nejsou již žádné životaschopné bakterie nebo jejich počet je pod hranicí detekce kultivací [20].

2.2 Mléko a mléčné výrobky

Mléko a mléčné výrobky jsou nejvíce prostudovanou skupinou potravin. Mikrobiální rozmanitost mléka se mění i v průběhu laktace v závislosti na potravě. Literatura uvádí, že se nezmění počty laktobacilů, ale počty stafylokoků při přechodu ze stájového na venkovní krmení. Při použití nekultivačních metod byly odhaleny mikroorganismy, které byly dříve spojovány jen se sýry, ale běžně se vyskytují už v mléce. Sezónní odchylky v mikroflóře mohou následně ovlivnit sensorické vlastnosti výrobků. Je velmi zajímavé, že mikroorganismy jsou variabilní i v závislosti na nadmořské výšce, ve které se dané zvíře pohybovalo. Toto zjištění je důležité zejména pro výrobu sýrů s chráněným označením původu. [22]

Největší rozmanitost mikrobiální mikroflóry je u farmářských sýrů, ve srovnání s průmyslově vyráběnými sýry bez ohledu na druh sýra. Nejčastěji tyto výrobci pro výrobu sýrů využívají syrového mléka [22]. Za použití TGGE techniky byly 4 vzorky mozzarely porovnávány v mikrobiální rozmanitosti. Tyto 4 vzorky byly vyráběny z různých surovin. První vzorek byl vyroben z pasterovaného mléka za použití komerčních mlékárenských kultur, druhý vzorek ze syrového buvolího mléka a přírodní syrovátkové kultury, třetí vzorek ze syrového kravského mléka a přírodní termofilní kultury a poslední vzorek byl vyroben pouze ze syrového kravského mléka bez přídavku startérových bakterií mléčného kvašení. Nejvíce rozmanitou mikroflóru obsahoval poslední výrobek, ve kterém byl detekován navíc od ostatních výrobků rod *Enterococcus* a druh *Leuconostoc lactis* [23].

Tradiční slovenský sýr brynza je vyráběn z ovčího tvarohu. Při tradiční salašové výrobě z nepasterovaného ovčího mléka jsou ve výrobku přítomny mikroorganismy rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, aerobní mezofilní bakterie, koliformní bakterie, *Escherichia coli*, *Sta-*

phylococcus spp., koaguláza pozitivní *Staphylococcus aureus*, kvasinky a plísně rodu *Geotrichum* [24].

2.3 Víno a hroznové víno

Réva vinná je nejčastěji napadána plísní *Platospira viticola*, která způsobuje padlí a plísní *Botrytis cinerea*, které způsobuje šedou hnilobu hroznů. Velké množství plísní poškozuje již hroznové víno, ale nemá schopnost růst ve vínech nebo negativně ovlivňovat jakost vína [25]. Octové bakterie jsou schopny růst ve víně a ovlivňovat jakost vína. Na povrchu hroznů může být velké množství bakterií, které jsou běžně přítomny v přírodě nebo souvisejí s výrobou potravin. Tyto bakterie by neměly být začleněny do výroby vína, ačkoliv nemají vliv na kvalitu vína. Některé nekulturní kvasinky rodu *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida* nebo *Metschnikowia* tvoří křís na hladině a zároveň je víno jakostně ovlivněno senzorycky nepřijatelnými pachutěmi. Nejdůležitější kvasinka při výrobě vína je *Saccharomyces cerevisiae*, ale i jiné kvasinky se účastní kvasného procesu, jako jsou *S. bayanus*, *S. pastorianus* a *S. paradoxus* [26].

2.4 Stolní olivy

Stolní olivy jsou nejoblíbenější kvašenou zeleninou pro západní svět. Hlavní dvě metody pro fermentaci oliv jsou španělská metoda, pro zelené olivy a řecká metoda, pro olivy černé. Důležitým faktorem pro správnou fermentaci oliv je mikrobiální společenství a jeho dynamika po celou dobu fermentace. Laktobacily jsou přirozenou součástí mikroflóry oliv. V menších množstvích jsou přítomny i bakterie rodů *Lueconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Pediococcus*. Použitím čistých kultur urychlíme proces tvorby kyseliny mléčné a tím dojde i k rychlejšímu poklesu pH. Poklesem pH lze zabránit růstu patogenních mikroorganismů jako je *Escherichia coli* O157:H7 [27].

2.5 Jedlý hmyz

Všeobecně se nejčastěji zkoumá hmyz jako vektor přenosu patogenních mikroorganismů. Stanovení celkového počtu mikroorganismů na 4 druzích jedlého hmyzu prokázalo počty 10^5 až 10^6 KTJ/g. Jedná se o vzorky *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, *Galleria mellonella* a *Acheta domestica*. Tyto vzorky byly získány z farmy na hmyz. Mikrobiální mikroflóra se skládala převážně z G^+ bakterií, fekálních a celkových koliformních bakterií. G^+ populace bakterií byla tvořena *Micrococcus* spp., *Lactobacillus* spp. a *Staphylococcus* spp.

Z těchto 4 testovaných vzorků nebyla izolována *Salmonella* spp. ani *Listeria monocytogenes* [28].

Velmi důležitý proces je skladování jedlého hmyzu. Pro stanovení vlivu kulinářské úpravy s následným uchováním výrobku při 5 až 7 °C byly použity vzorky *Tenebrio molitor* a *Acheta domestica*. Vzorky byly analyzovány čerstvé, vařené, pečené, čerstvé chlazené a uvařené chlazené. Z čerstvých vzorků byly izolovány zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae* a sporotvorné bakterie. Izolované bakterie nepatřily k patogenním druhům. Ve vzorcích, které byly povařeny po dobu 5 minut, byly inhibovány zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, ale bakteriální spory tento záhřev neusmrtil. Kvůli přítomnosti sporotvorných bakterií je nutno uchovávat jedlý hmyz při 5 až 7 °C, nízké teploty zabránily kažení vařeného hmyzu až po dobu 2 týdnů. Samotné pražení nemá dostatečný velký vliv na přítomné bakterie, a proto je vhodné před samotné pražení začleňovat krátké povaření. Když se shrnou poznatky, které jsou o hygienickém zacházení s jedlým hmyzem, tak správným skladováním by se mělo zabránit potenciálnímu zdravotnímu riziku z konzumace [29]

2.6 Jedlé květy

Většina mikroorganismů, které jsou součástí mikrobiálního společenstva jedlých květů, ovoce a zeleniny, jsou z půdní mikroflóry. Půdní mikroflóra je velmi rozmanitá a obsahuje velké množství různorodých společenství. Na povrch jedlých květů se dostanou působením přenosu půdních částic větrem, zavlažováním a hmyzem. Jen málo studií se zabývá mikroflórou na povrchu jedlých květů. Dosavadní výsledky naznačují, že součástí mikroflóry jsou velmi malé počty mikroorganismů přibližně 10^4 , kvůli antimikrobiálním účinkům látek obsažených v květech. Tyto mikroorganismy jsou vázány na nektar jedlých květů nejčastějším zástupcem je *Staphylococcus* spp., aktinomyceta *Ipomoea digitata*, kvasinky a plísňe [30].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo izolovat DNA ze 4 vzorků jedlého hmyzu a jednoho jedlého květu. Získanou DNA podrobit analýze ARDRA a TGGE pro studium diverzity mikroflóry těchto netradičních potravin.

4 MATERIÁL

4.1 Charakteristika vzorků

Vzorky jedlého hmyzu (Tab. 1) byly vytřepány do fyziologického roztoku po dobu 15 minut.

Tab. 1. Vzorky jedlého hmyzu použité pro molekulární stanovení.

vzorek č.	vzorek	stádium vývoje	zamraženo
1	<i>Gryllus assimilis</i>	nymfa	13.9.2012
2	<i>Bombyx mori</i>	housenka	20.6.2012
3	<i>Bombyx mori</i>	kukla	20.6.2012
4	<i>Galleria mellomella</i>	housenka	20.6.2012

Kmen *Escherichia coli* 17 byl získán ze sbírky Ústavu potravinářského inženýrství, Fakulty technologické, Univerzity Tomáše Bati v Zlíně. Před odebráním vzorku pro izolaci DNA byla *E. coli* uchovávána na živné půdě MPA.

Vzorek jedlého květu byl odebrán z hotového jídla firmy Harmony Servis, Mikulčice, Česká republika dne 24. 8. 2012.

4.2 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga Hermle Z100M Hermle (Labortechnik, Německo)
- Termoblok BIO TDB-100 Dry block thermostat- (Biosan Ltd., Litva)
- PCR box Bioair instruments, aura PCR (BioAir Itálie)
- Thermo cykler Peltier Therma celer (Bio-Rad, USA)
- Thermo cykler piko thermal celer (Finnzymes instruments, Finsko)
- TGGE elektroforéza TGGE Maxi System (Biometra, Německo)
- UV-transluminátor UC-4100- (UltraLum Inc., USA)
- Mikropipety (Eppendorf, USA)
- Běžné laboratorní sklo a další spotřební materiál

4.3 Chemikálie

Seznam použitých primerů je uveden v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2. Přehled použitých primerů.

primer	5'-3' sekvence	předpokládaná délka produktu
fD1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	~1500 bp
rD1	AAG CAG GTG ATC CAG CC	
341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	566 bp
907r	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	
FA	GAG CAG CCG CGC TAA TAC	~400 bp
RA	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	
GC341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	177 bp
518r	ATT ACC GCG GCT GCT GG	

Použité restriční enzymy (Fermentas LIFE SCIENCE, USA) a jejich rozpoznávací sekvence jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3. Přehled použitých restričních enzymů.

enzym	rozpoznávaná 5'-3' sekvence
<i>Hae</i> III	GG↓CC
<i>Eco</i> R I	G↓AATTC
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG
Hinf I	GA↓NTC*

* N vyjadřuje jakýkoli nukleotid

- DNazol Genomic DNA Isolation Reagent, (GIBCO BRL, USA)
- Agaróza Cambrex Bio Science (Rockland, Inc., USA)
- Voda pro molekulární biologii Nuklease free water (Promega, USA)
- PCR pufr 10x ThermoPol Reaction Buffer, (BioLabs Inc., New England)
- Go Taq Hot Start Master Mix (Promega, USA)
- Go Taq Hot Start Green Master Mix (Promega, USA)

- 50x TAE pufr Tris-Acetate EDTA (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
- 8 nethoxy psoralen (Fluka Biochemika, USA)
- dNTP mix premix 12,5 mM dATP, dCTP, dGTP a dTTP (Jena Bioscience GmbH, Německo)
- Etidiumbromid (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
- Gel Red Nucleic Acid 10 000x in DMSO (Biotium, USA)
- 2x FastStart Mastermix PCR (Roche Diagnostics, Německo)
- 6x nanášecí pufr (Top Bio, Česká republika)
- DNA marker 100 bp (BioLabs Inc., New England)
- DNA marker 1,0 kbp (BioLabs Inc., New England)
- Akryl amid (Sigma-aldrich, USA)
- Močovina (Promega, USA)
- Formamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)
- APS 10% persíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- TEMED N,N,N',N'-tetramylelendiaminu (Sigma-Aldrich, USA)
- 0,1 % Tween 20 thermal coupling roztok, (ROCHE Diagnostics, Německo)

5 METODY

5.1 Izolace DNA

DNA byla izolována ze vzorků a z bakterie *Escherichia. coli* pomocí komerčního výrobku DNAzol. Mikrobiální suspenze byla centrifugována (Labortechnik) a promývána PCR pufrem. Po promytí byl přidán 0,1 ml DNAzolu, ve kterém byl pelet resuspendován a obsah byl promíchán převrácením. Po dobu 10 minut se nechal působit DNAzol na buňky při laboratorní teplotě. Potom byla provedena centrifugace při 10 000 g/10 min. K supernatantu bylo přidáno 0,5 ml 96% ethanolu a obsah byl promíchán převrácením. Směs reagovala po dobu 3 minut při laboratorní teplotě a poté byla centrifugována při 5 000 g/5 min. Supernatant byl odstraněn a směs byla resuspendována v 1 ml 75% ethanolu. Poté byla provedena centrifugace při 1 000 g/2 minut. Promytí bylo provedeno 2x. Na závěr byla izolovaná DNA rozpuštěna ve 200 μ l sterilní vody prosté DNA a vzorky byly zamrazeny [31].

5.2 PCR

PCR amplifikace byla provedena v termocykleru v celkovém objemu 50 μ l za použití primerů FA a RA. Složení reakčního mixu je uvedeno v tabulce (Tab. 4.). Výsledný PCR produkt o délce 400 bp byl následně použit pro restrikční štěpení.

Tab. 4. Složení směsi pro PCR.

složení směsi	50 μ l
10x PCR pufr	5 μ l
dNTP mix	1 μ l
primer FA	1 μ l
primer RA	1 μ l
Taq DNA-polymeráza	0,3 μ l
sterilní vody prosté DNA	47,3 μ l
templát DNA	1 μ l

Amplifikační profil (Tab. 5.) byl určen podle optimálních podmínek pro použité primery.

Tab. 5. Průběh PCR a počet cyklů.

počáteční denaturace	94 °C	7 min	
denaturace	94 °C	1 min	34 cyklů
annealing	55 °C	1,5 min	
extenze	72°C	1 min	
závěrečná extenze	72°C	10 min	

5.3 Agarózová gelová elektroforéza

PCR produkty byly detekovány pomocí agarózové elektroforézy. Gelová elektroforéza probíhala v prostředí 1x TAE. Agarózový gel byl připraven s ethidiumbromidem v konečné koncentraci 0,5 µg/ml gelu. Na gel bylo nanášeno 12 µl směsi, složené z 1 µl amplifikovaného PCR produktu, 9 µl destilované vody a 2 µl 6x nanášecího pufru. Pro posouzení velikostí jednotlivých amplikonů byl použit 1 kb a 100 bp DNA marker. Elektroforetická separace probíhala po dobu 35 minut, při zvoleném napětí 90 V. DNA byla vizualizována pomocí UV transiluminátoru .

5.4 ARDRA

K 10 µl amplifikovanému PCR produktů o délce 400 bp (primery FA a RA) byly přidány 3 µl pufru pro restriční štěpení, 16 µl sterilní vody prosté DNA a 1 µl restričního enzymu. Směs byla důkladně promíchána špičkou a krátce (10 s) stočena v centrifuze Hermle. Směs se nechala reagovat při 37 °C 30 minut. Poté byla směs zahřáta na 80 °C/5 min v termobloku. Produkty restričního štěpení byly nanášeny na 1,8 % agarózový gel, na gel bylo nanášeno 30 µl produktu a 15 µl 100 bp DNA markeru. Na gel bylo působeno 50 minut napětím 120 V. Poté byl gel vyhodnocen v UV-transluminátoru [32].

5.5 TGGE

5.5.1 Nested PCR

Amplifikace metodou nested PCR byla využita pro úpravu vzorků DNA před TGGE analýzou. V 1. stupni PCR reakce byl celkový objem reakční směsi 20 µl. Do směsi byly použity primery fD1 a rD1. Při dalším pokusu byly použity primery 341f a 907r.

Tab. 6. Složení směsi pro 1. stupeň nested PCR.

složení směsi	20 μ l
Mastermix (ROCHE)	10 μ l
MgCl ₂	0,25 μ l
primer rD1	1 μ l
primer fD1	1 μ l
sterilní voda	6,75 μ l
templát DNA	1 μ l

1. stupeň Nested PCR byl proveden v termo cykleru (Finnzymes instruments). Amplifikační profil termo cykleru je uveden v tabulce (Tab. 7.). Amplifikační profil byl totožný pro dvojice primerů fD1 a rD1 i pro primery 341f a 907r.

Tab. 7. Průběh 1. stupně Nested PCR a počet cyklů.

počáteční denaturace	95 °C	5 min	
denaturace	95 °C	1 min	9 cyklů
annealing	57 °C každý cyklus se teplota snižovala o 0,5 °C	1 min	
extenze	72 °C	1 min	
denaturace	95 °C	1 min	24 cyklů
annealing	52 °C	1 min	
extenze	72 °C	1 min	
závěrečná extenze	72 °C	10 min	

Pro amplifikaci 2. stupně byl použit produkt PCR z 1. stupně. Celkový objem reakční směsi byl 30 μ l a pro zabránění polymerace kontaminace byl použit psoralen, který byl apliko-

ván do každé směsi před přidavkem DNA matrice z 1. stupně. Směs byla následně vysvícena v UV transiluminátoru po dobu 5 minut. Složky směsi jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8.).

Tab. 8. Složení směsi pro 2. stupeň nested PCR.

Složení směsi	30 μ l
Mastermix (Promega)	15 μ l
Psoralen	0,3 μ l
Primer GC 341f	1,2 μ l
Primer 518r	1,2 μ l
sterilní vody prosté DNA	11,1 μ l
templát DNA	1,2 μ l

2. stupeň nested PCR byl proveden v termo cykleru (Finnzymes instruments). Amplifikační profil termo cykleru je uveden v tabulce (Tab. 9.).

Tab. 9. Průběh 2. stupně nested PCR a počet cyklů.

počáteční denaturace	95 °C	5 min	
denaturace	95 °C	0,5 min	9 cyklů
annealing	62 °C každý cyklus se teplota snižovala o 0,5 °C	0,5 min	
extenze	72 °C	0,5 min	
denaturace	95 °C	0,5 min	24 cyklů
annealing	56 °C	0,5 min	
extenze	72 °C	1 min	
závěrečná extenze	72°C	10 min	

5.5.2 Příprava aparatury pro TGGE

Příprava gelu byla velmi náročná, kvůli správnému složení skleněné aparatury pro polymeraci gelů. Během přípravy gelu bylo nutné mít ochranné pomůcky (rukavice, ochranné brýle), protože bylo manipulováno s karcinogenními a toxickými látkami [33].

Aparatura se skládá ze dvou skleněných desek, které musí být důkladně omyty a osušeny. Vnitřní deska bez spaceru byla navlhčena několika ml destilované vody a na ni byla přitisknuta polybond fólie, která byla na horní straně opatřena páskou. Na vnitřní desku se spacerem bylo důkladně přiloženo těsnění, aby nedošlo k vytečení gelu. Obě skleněné desky byly k sobě přichyceny kovovými sponami [33].

5.5.3 Příprava gelu pro TGGE

Do 100 ml kádinky s míchadlem bylo naváženo 24 g močoviny, napipetováno 10 ml akrylamidu, 10 ml formamidu, 2 ml 2x TAE, 2,5 ml glycerolu a 5 ml vody pro molekulární biologii. Směs byla zahřívána při 50 °C a míchána po dobu 30 minut do úplného rozpuštění močoviny. Po rozpuštění močoviny se směs zchladí mícháním na pokojovou teplotu a přidají se polymerační činidla: 50 µl persíranu amonného (APS 10%) a 110 µl N,N,N,N,-tetramethyldiaminu (TEMED). Po přidání polymeračních činidel byla směs rychle a dokonale promíchána. Injekční stříkačkou byla směs dávkována do připravené skleněné aparatury. Dávkování bylo nutno provést rychle a precizně z důvodů rychlé polymerace směsi. K polymeraci gelu dochází při 30 °C v termostatu po dobu 3 hodin. Po uplynutí polymerační doby byly z aparatury odstraněny spony a gel byl vyjmut, aby nedošlo k jeho poškození [33].

5.5.4 TGGE

Elektroforéza probíhala v TGGE Maxi Systém, kde je vedení elektrického proudu zprostředkováváno pomocí dvou speciálních žinek namočených jedním koncem do pufru 2x TAE a druhým koncem jsou položeny na gel [33].

Povrch termobloku byl navlhčen 0,1 % Tween 20 a do zásobníků na pufr byl nalit 2x TAE. Gel byl po polymeraci opatrně vyjmut ze skleněné aparatury a byl položen na termoblok, ke kterému byl následně upevněn lepicí páskou. Speciální žinky, které byly povařeny v destilované vodě, byly namočeny do zásobníků pufru. Na gel byl přiložen aplikátor a krycí fólie tak, aby jedna strana krycí fólie končila těsně pod aplikátorem a druhý konec přibližně 2 cm od konce gelu. Do aplikátoru bylo nanášeno 10 µl vzorku DNA z 2. stupně

PCR a do první a poslední jamky bylo aplikováno 10 μ l 100bp DNA standardu. Na obě strany gelu byly přiloženy žínky tak, aby se dotýkaly jak gelu, tak i pufru. Nakonec byl termoblok přikryt víkem a celá aparatura byla přikryta víkem s elektrodami. Program elektrolyzy byl nastaven na 18 hodin, při napětí 130 V a proudu 36 mA. Počáteční teplota na termobloku byla 38 °C a koncová teplota 58 °C [33].

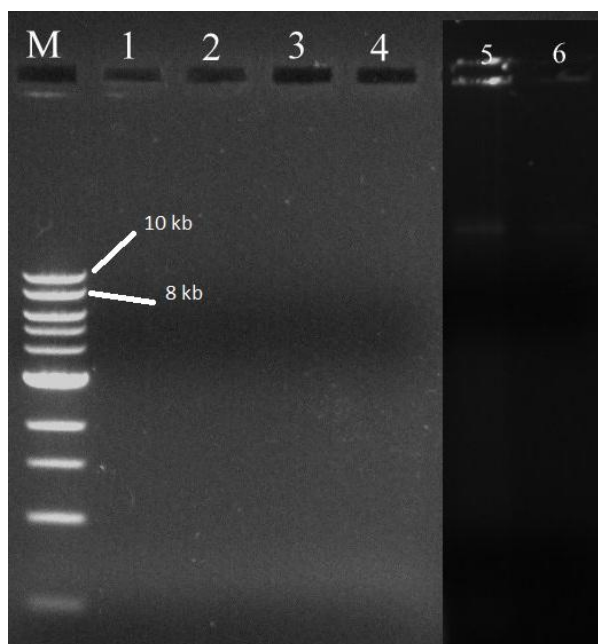
Gel byl po uplynutí elektroforézy vyjmut z TGGE aparatury a vložen do plastové vany. Do plastové vany bylo nalito 500 ml elektroforetického pufru a 50 μ l barviva. Gel s fragmenty byl vložen do roztoku pufru s barvivem GelRed Nucleic acid 10 000x in DMSO. Plastová vana s gelem byla překryta hliníkovou fólií a položena na třepačku, u které byla stanovena frekvence 450 otáček za minutu. Gel byl třepán 3 hodiny. Po uplynutí doby byl gel vyjmut, osušen a vložen do UV transiluminátoru [33].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byly studovány čtyři vzorky jedlého hmyzu a jeden vzorek jedlého květu. Nejdůležitějším krokem před procesem PCR je provedení izolace mikrobiální DNA. Ze všech vzorků a ze sbírkového kmene *E. coli* byla izolována DNA. Tato DNA byla dále analyzována metodou ARDRA a TGGE.

6.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena za použití komerční soupravy DNAzol. Po izolaci DNA byla provedena elektroforéza na 1% agarózovém gelu (Obr. 1). Výtěžek DNA byl velmi nízký u všech vzorků netradičních potravin, zřejmě z toho důvodu, že se jednalo o oplachy a mikroorganismů na povrchu vzorků nebylo mnoho.



Obr. 1. Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované ze vzorků. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, M 1 kb marker.

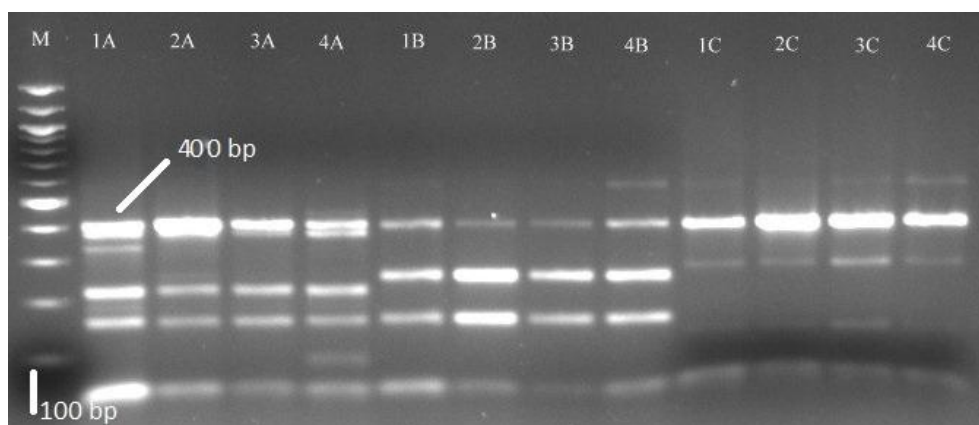
Pro izolaci DNA je možné použít mnoho metod. Důležitý parametr pro určení vhodnosti metody je, aby bylo DNA získáno co největší množství a v dostatečné čistotě. Použitím metody extrahování mikrobiální DNA pomocí DNAzolu získáme DNA jak čistou, tak i v dostatečném množství pro další molekulární stanovení. DNA extrahovaná ze vzorků jed-

lého hmyzu nebyla detekovatelná, protože na vzorcích bylo přítomno velmi malé množství mikroorganismů. Na druhou stranu DNA izolovaná z bakterie *Escherichia coli*, jejíž buňky byly odebrány přímo ze živného média, byla dobře na agarózovém gelu detekovatelná (Obr. 1).

6.2 ARDRA

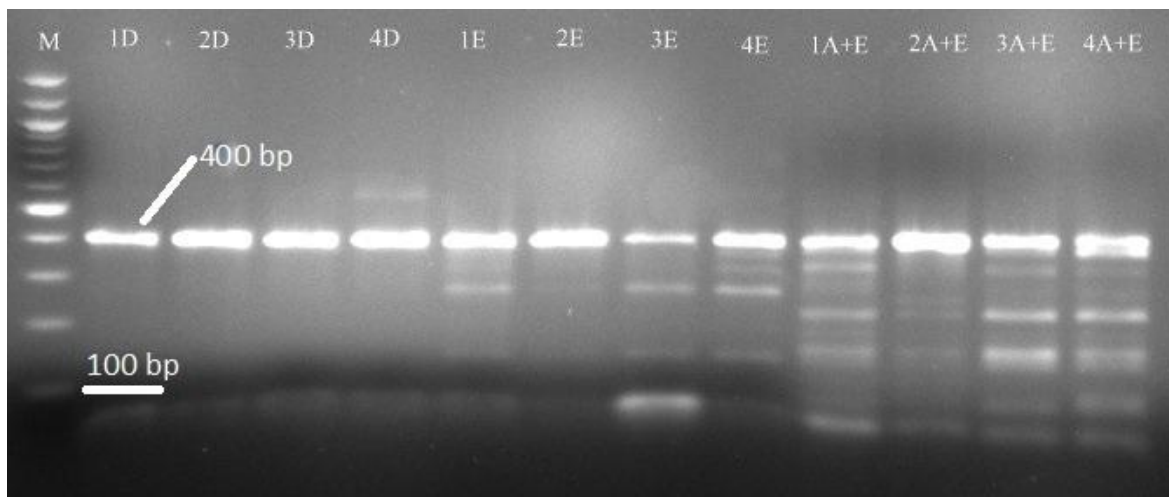
Dalším cílem byla restriční analýza amplifikované DNA. Amplifikace byla provedena metodou PCR s použitím primerů FA a RA, které nasedají na oblast genu pro 16S rRNA. Výsledné PCR produkty měly délku 400 bp. Pro následné restriční štěpení byly použity restriktázy *Hae* III, *Eco*R I, *Hind* III, *Xho* I, *Hinf* I a každý vzorek byl ještě štěpen kombinací restriktáz *Hae* III a *Hinf* I.

Na obrázku gelu po elektroforéze (Obr. 2) jsou zachyceny produkty restričního štěpení PCR produktů z izolátů vzorků jedlého hmyzu. Byly použity restriktázy *Hae* III, *Eco*R I a *Hind* III. Pro zjištění délky restričních fragmentů byl použit 100 bp DNA marker.



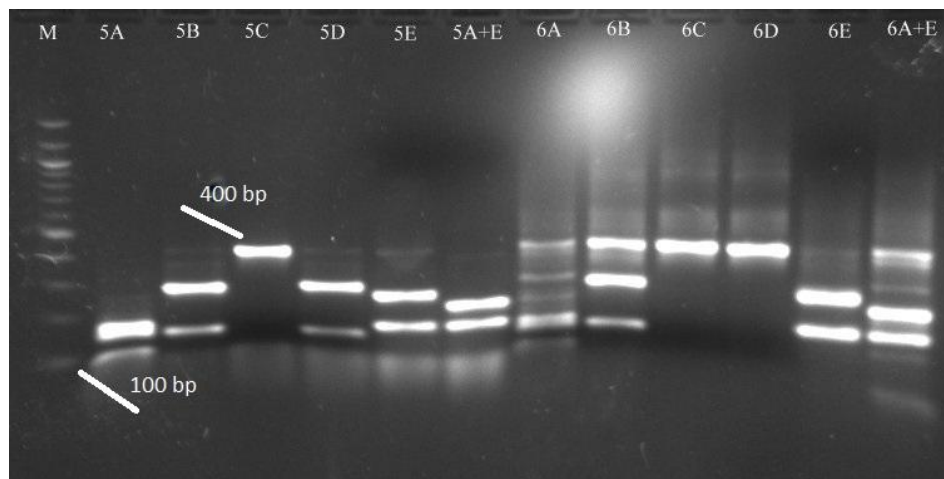
Obr. 2. ARDRA. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (housenka), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, A. *Hae* III, B. *Eco*R I, C. *Hind* III, M 100 bp DNA marker.

Na dalším obrázku gelu (Obr. 3) jsou zachyceny produkty restričního štěpení PCR produktu z izolátu jedlého hmyzu. Byly použity restriktázy *Xho* I, *Hinf* I a kombinace *Hae* III + *Hinf* I. Pro zjištění délky restričních fragmentů byl použit 100 bp DNA marker.



Obr. 3. ARDRA. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, D. *Xho* I, E. *Hinf* I, A+E. *Hae* III + *Hinf* I, M. 100 bp DNA marker.

Další obrázek elektroforetického gelu (Obr. 4) zobrazuje štěpení PCR produktu z *Escherichia coli* a jedlého květu. Byly použity restriktázy *Hae* III, *Eco*R I a *Hind* III, *Xho* I, *Hinf* I a kombinace *Hae* III + *Hinf* I. Pro zjištění délky restrikních fragmentů byl použit 100 bp DNA marker.



Obr. 4. Použití restrikních enzymů na amplifikovanou DNA. 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, A. *Hae* III, B. *Eco*R I, C. *Hind* III, D. *Xho* I, E. *Hinf* I, A+E. *Hae* III + *Hinf* I, M. 100 bp DNA marker.

Byly porovnávány délky fragmentů, které byly získány použitím jednotlivých enzymů. Dále bylo porovnáváno množství PCR produktu o délce 400 bp ze vzorků hmyzu, *Escherichia coli* a jedlého květu, které zůstalo po restrikním štěpení.

6.2.1 *Hae* III

Ve všech vzorcích byla přítomna sekvence GGCC . Ve vzorku *Gryllus assimilis* (Obr. 2) vznikly celkem čtyři různě dlouhé úseky, ve vzdálenosti přibližně 180 bp, 190 bp, 230 bp a 340 bp. Ve vzorku *Bombyx mori* (housenka) (Obr. 2) vznikly dva úseky o přibližné délce přibližně 180 bp a 230 bp. Ze vzorku *Bombyx mori* (kukla) (Obr. 2) vznikly také dva úseky, přibližně o délce 180 bp a 230 bp. U vzorku *Galleria mellonella* (Obr. 2) vznikly čtyři úseky, přibližně o velikosti 100 bp, 180 bp 230 bp a 380 bp. Vzorek *Escherichia coli* (Obr. 4) byl plně rozštěpen na přibližně 180 bp dlouhý úsek. Vzorek jedlého květu (Obr. 4) byl štěpen na tři úseky dlouhé přibližně 180 bp, 230 bp a 300 bp. Většina vzorku jedlého květu byla rozštěpena, při vizuálním porovnání jasů bandu u stejného vzorku pro *Hae* III a *EcoR* I. Kromě vzorku *Escherichia coli*, který byl plně rozštěpen, zůstalo vždy velké množství nerozštěpené DNA.

6.2.2 *EcoR* I

Všechny vzorky byly štěpeny na úseky o přibližné délce 180 bp a 260 bp. Vzorek *Escherichia coli* byl opět plně rozštěpen (Obr. 4). U vzorků *Gryllus assimilis*, *Bombyx mori* (housenka), *Bombyx mori* (kukla) a *Galleria mellonella* (Obr. 2) bylo rozštěpeno více DNA než u *Hae* III, ale u vzorku jedlého květu (Obr. 4) nebylo restriční štěpení tak účinné, jako u ostatních vzorků. Většina mikroorganismů, které byly přítomny na vzorcích a *Escherichia coli*, mají přítomnu sekvenci CTCGAG ve stejné pozici v genu pro 16S rRNA.

6.2.3 *Hind* III

U vzorků *Gryllus assimilis*, *Bombyx mori* (housenka), *Bombyx mori* (kukla) a *Galleria mellonella* vznikalo po štěpení *Hind* III (Obr. 2) velmi malé množství produktů o přibližné délce 170 bp a 280 bp. Vzorek *Escherichia coli* a jedlého květu (Obr. 4) nebyl štěpen vůbec. Jen velmi málo mikroorganismů, přítomno na povrchu vzorků, má ve zkoumaném úseku DNA sekvenci AAGCTT.

6.2.4 *Xho* I

Vzorky *Gryllus assimilis*, *Bombyx mori* (housenka), *Bombyx mori* (kukla), *Galleria mellonella* (Obr. 3) a jedlého květu (Obr. 4) nebyly štěpeny. Vzorek *Escherichia coli* (Obr. 4) byl úplně rozštěpen na úseky o přibližné délce 160 bp a 300 bp. Na žádném vzorku jedlého hmyzu a na vzorku jedlého květu nebyl mikroorganismus, který by na úseku DNA měl sekvenci CTCGAG.

6.2.5 *Hinf* I

Ve všech vzorcích bylo přítomno, alespoň minimálního množství DNA s úsekem GANTC (N – jakýkoliv nukleotid). Ze vzorku *Gryllus assimilis* (Obr. 3) vznikly tři úseky o přibližné délce 180 bp, 270 bp a 310 bp. U vzorku *Bombyx mori* (housenka) (Obr. 3) vzniklo velmi malé množství dvou úseků 180 bp a 270 bp. Ze vzorku *Bombyx mori* (kukla) (Obr. 3) vznikly tři úseky, také o přibližné délce 180 bp, 270 bp a 310 bp jako u vzorku *Gryllus assimilis*. U vzorku *Galleria mellonella* (Obr. 3) vznikly čtyři úseky o přibližné délce 180 bp, 270 bp, 310 bp a 350 bp. Vzorek *Escherichia coli* (Obr. 4) byl plně rozštěpen na úseky o přibližné délce 180 bp a 270 bp. Vzorek jedlého (Obr. 4) květu byl skoro úplně rozštěpen na dva úseky o přibližné délce 180 bp a 300 bp. U vzorku jedlého květu byla přítomna u většiny mikroorganismů sekvence, rozpoznávaná restrikčním enzymem *Hinf* I.

6.2.6 *Hae* III + *Hinf* I

Jako kombinace restrikčních enzymů byla použita kombinace *Hae* III a *Hinf* I. Byly štěpeny úseky se sekvencí GGCC a GANTC. Ve vzorcích *Gryllus assimilis*, *Bombyx mori* (housenka), *Bombyx mori* (kukla) a *Galleria mellonella* (Obr. 3) vzniklo šest úseků o přibližné délce 90 bp, 180 bp, 200 bp, 220 bp, 270 bp a 310 bp. U vzorku *Escherichia coli* (Obr. 4) vznikly dva úseky, úplným rozštěpením DNA matrice, o přibližné délce 180 bp a 220 bp. Ze vzorku jedlého květu (Obr. 4) vzniklo pět úseků o přibližné délce 160 bp, 180 bp, 270 bp, 330 bp a 380 bp.

Pokud se vzorky porovnávají mezi sebou, nejsou nalezeny výraznější rozdíly. Větší rozdíl je u *Escherichia coli*, protože se jedná o jeden kmen. Rozdíl je v množství rozštěpené DNA u vzorků jedlého hmyzu a vzorku jedlého květu. Malé rozdíly byly především v množství rozštěpené DNA matrice.

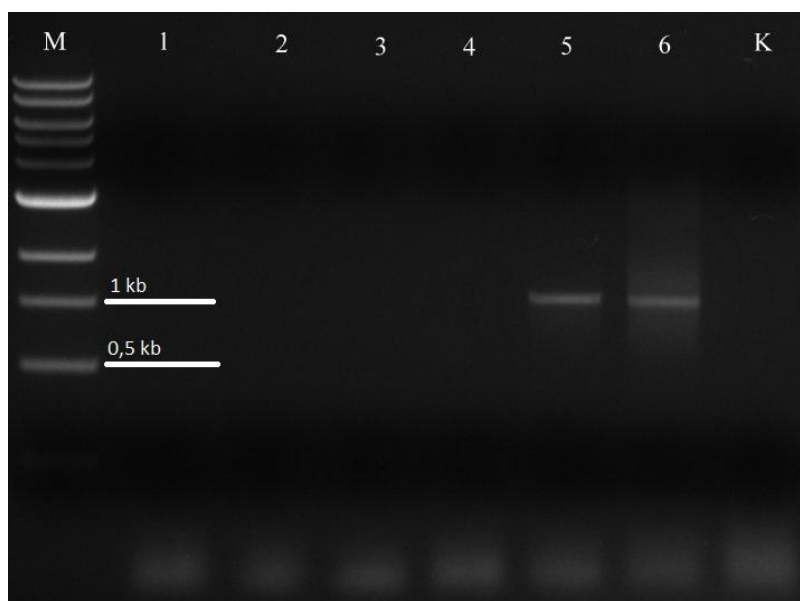
Pro lepší porovnání rozdílů délky fragmentů DNA, by bylo vhodnější použít gel s větším množstvím agarózy. Při použití 1,8% agarózového gelu nedojde k dokonalému rozdělení a bandy jsou příliš u sebe. Pro určení mikrobiální diverzity by bylo vhodné porovnat tyto lépe rozdělené fragmenty s databází [17].

6.3 TGGE

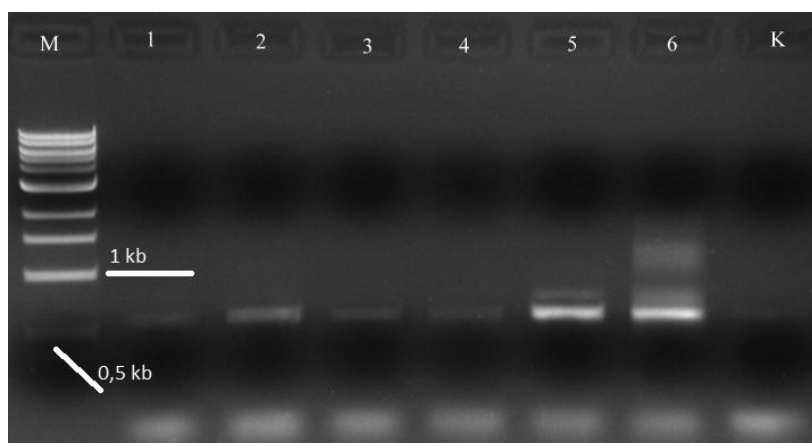
Pro analýzu mikrobiálního společenstva testovaných vzorků byla jako další metoda zvolena metoda TGGE. DNA izolovaná ze vzorků byla nejprve amplifikována metodou nested PCR. Pro kontrolu čistoty práce byla přidána negativní kontrola, která neobsahovala DNA

matrici. Nejdříve byly pro 1. stupeň nested PCR používány primery fD1 a rD1. Po provedení PCR byl vzorek nanesen na 1% agarózový gel s ethidium bormidem v 1x TAE pufru (Obr. 5).

Kvůli velmi nízkému výtěžku PCR produktu byly v dalším opakování použity jiné primery, a to 341f a 907r a celá metoda byla opakována (Obr. 6).

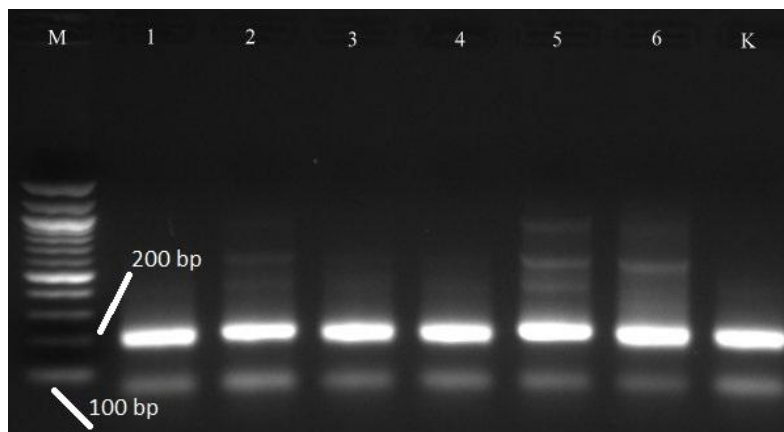


Obr. 5. 1. stupeň nested PCR s primery fD1 a rD1. M. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (housesnake), 3. *Bombyx mori* (pupa), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, 1,0 kbp DNA marker.



Obr. 6. 1. stupeň nested PCR s primery 341f a 907r. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (housesnake), 3. *Bombyx mori* (pupa), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, M. 1,0 kbp DNA marker.

Pro 2. stupeň nested PCR byly použity primery GC341f a 518r a psoralen. Psoralen byl přidáván pro eliminování kontaminace. Po provedení PCR reakce byly produkty PCR naneseny na 1% agarózový gel s ethidium bromidem v 1x TAE pufru (Obr. 7).

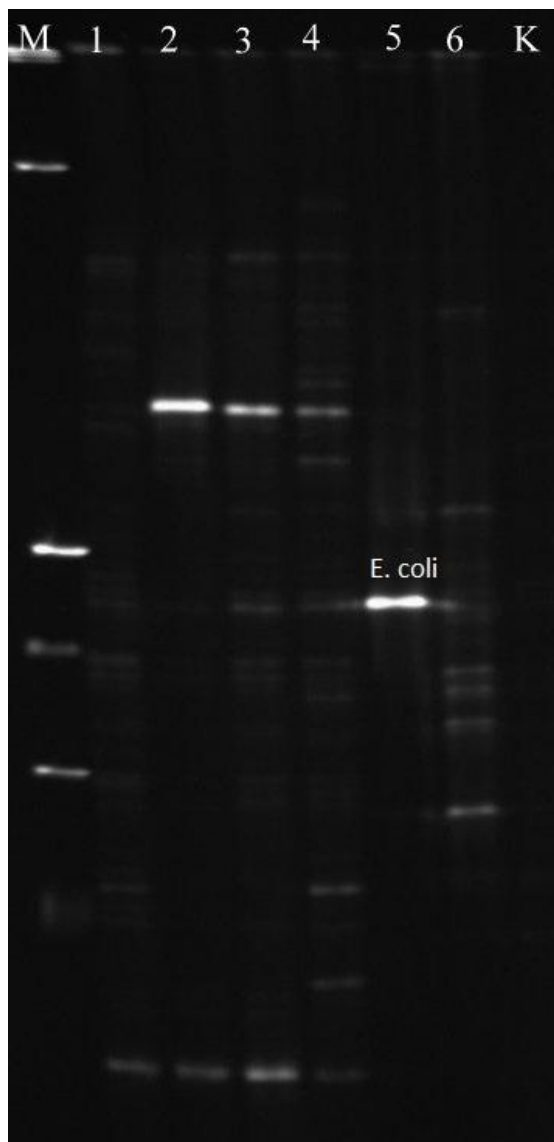


Obr. 7. 2. stupeň nested PCR. M. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (housenka), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, 1,0 kbp DNA marker.

Při 1. stupni nested PCR byly pozměněny primery, z důvodu malého počtu detekovatelných vzorků. Detekovatelné byly vzorky *Escherichia coli* a jedlého květu. Po změně primerů z fD1 a rD1 na 341f a 907r byla pozorována pozitivní změna ve zvětšení množství PCR produktů. Pro 2. stupeň nested PCR byly použity produkty primerů 341f a 907r.

Do 2. stupně nested PCR byl do reakční směsi přidáván psoralen, aby reagoval s případnou kontaminací. Negativní kontrola i po přidavku psoralenu byla pozitivní, pozitivita byla vyvrácena po provedení TGGE, kde nebyl přítomen žádný band.

Několik prvních provedení vlastní TGGE se nezdařilo. DNA byla denaturována hned na začátku gelu. V dalším provedení TGGE (Obr. 8) byly vyměněny všechny používané chemikálie: akrylamid, močovina, glycerol, TEMED, sterilní voda, formamid. TGGE bylo provedeno znovu za stejných podmínek jako u předchozího provedení.



Obr. 8. TGGE analýza vzorků. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (housenka), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, M. 100 bp DNA standard

TGGE metodou bylo zjištěno, že každý vzorek obsahuje minimálně jeden mikroorganismus. Jako orientační body byl zvolen standard *Escherichia coli*. Díky znalosti DNA sekvence, která obsahuje přibližně 50 % GC, bylo možno určit, které bandy zastupují mikroorganismy s větším % GC a které mají více % AT párů [34].

Ve vzorku *Gryllus assimilis* bylo přítomno asi 14 kmenů, 6 kmenů obsahuje méně než 50 % GC, 2 kmeny obsahující přibližně 50 % GC, *Escherichia coli* a 5 kmenů obsahující více než 50 % GC.

Ve vzorku *Bombyx mori* (houseska) byly přítomny asi 3 kmeny, 1 kmen s méně než 75 % GC, *Escherichia coli* a 1 kmen obsahující více než 50 % GC.

Ve vzorku *Bombyx mori* (kukla) bylo přítomno asi 8 kmenů, 3 kmeny s méně než 50 % GC, 1 kmen s 50 % GC, *Escherichia coli* a 3 kmeny s více než 50 % GC.

Ve vzorku *Galleria mellonella* bylo přítomno asi 18 kmenů, 7 kmenů s méně než 50 % GC, 2 kmeny přibližně 50 % GC, *Escherichia coli*, a 8 kmenů obsahující více než 50 % GC.

Ve vzorku jedlého květu bylo přítomno 10 kmenů, 4 kmeny s méně než 50 % GC, 3 kmeny s přibližně 50 % GC, *Escherichia coli* a 2 kmeny s více než 50 % GC.

Nejvíce podobné mikroflóra byla u vzorků *Gryllus assimilis*, *Bombyx mori* (kukla) a *Galleria mellonella*, které mají nejvíce shodných bandů a zároveň byly nejvíce kmenově bohaté. Na vzorku *Bombyx mori* (houseska) byl stanoven nejmenší počet kmenů.

Při porovnání mikrobiální diverzity tradičních potravin s diverzitou jedlého hmyzu a jedlého květu bylo zjištěno, že v tradičních potravinách je přítomna mnohem větší rozmanitost mikroorganismů. Ve fermentovaných potravinách, kde se využívá čistých kultur, jsou tyto kultury často složeny z různých kmenů a poddruhů. Diverzita těchto výrobků je proto úzce specifická a není tak variabilní, jako u vzorků jedlého hmyzu a jedlého květu [21].

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá studiem mikrobiální diverzity v netradičních potravinách, jako je jedlý hmyz a jedlý květ. Znalostí mikroflóry potravin je získán přehled o možných technologických komplikacích při zpracování potravin. Pro stanovení diverzity jsou použity metody ARDRA a TGGE.

Na základě údajů uvedených v bakalářské práci, lze vyvodit následující závěry:

- Pro detekci mikroorganismů je není nutné kultivovat a lze detekovat i mikroorganismy, které jsou za běžných laboratorních podmínek nekultivovatelné.
- Kultivačními metodami zachytíme životaschopné a kultivovatelné mikroorganismy.
- Molekulárními technikami můžeme stanovit i již usmrcené mikroorganismy.
- Metodami fingerprintu nedokážeme rozlišit životaschopné a mrtvé buňky v potravinách.
- Metody fingerprintu jsou mnohem citlivější, ale zároveň náročnost na vybavení laboratoře a manuální zručnost je mnohem větší než u kultivačních metod.
- Pro identifikaci kmenů z TGGE metody je nutné využít sekvence, porovnání se standardy nebo použití hybridizace s fluorescenční sondou.
- Ve vzorcích jedlého hmyzu byla prokázána velká mikrobiální rozmanitost, zatímco jedlý květ měl mikroflóru zdatelně chudší.
- Přesné zastoupení mikroorganismů ve vzorcích by bylo získáno až po sekvenaci jednotlivých úseků DNA.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KIRK, Jennifer L, Lee A BEAUDETTE, Miranda HART, Peter MOUTOGLIS, John N KLIRONOMOS, Hung LEE a Jack T TREVORS. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, vol. 58, issue 2, s. 169-188. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701204000983>
- [2] FAKRUDDIN, Md a Khanjada Shahnewaj Bin MANNAN. Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*. 2013-09-19, vol. 42, issue 1, s. -. DOI: 10.4038/cjsbs.v42i1.5896. Dostupné z: <http://www.sljol.info/index.php/CJSBS/article/view/5896>
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 9788020017031.
- [4] IACUMIN, Lucilla, Francesca CECCHINI, Marisa MANZANO, Milena OSUALDINI, Daria BOSCOLO, Sandi ORLIC a Giuseppe COMI. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*. 2009, vol. 26, issue 2, s. 128-135. DOI: 10.1016/j.fm.2008.10.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008002037>
- [5] GIRAFFA, Giorgio a Erasmo NEVIANI. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 67, 1-2, s. 19-34. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00445-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501004457>
- [6] KOČÁREK, Eduard. Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, *biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004, 211 s. ISBN 8071833266
- [7] QUIGLEY, Lisa, Orla O'SULLIVAN, Tom P. BERESFORD, R. Paul ROSS, Gerald F. FITZGERALD a Paul D. COTTER. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, vol. 150, 2-3, s. 81-94. DOI:

- 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511004454>
- [8] MUYZER, Gerard a Xuân Nam PHẠM. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Current Opinion in Microbiology*. 1999, vol. 2, issue 3, s. 317-322. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80055-1. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527499800551>
- [9] ERCOLINI, Danilo. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, vol. 56, issue 3, s. 297-314. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.006. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770120300321X>
- [10] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 1. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7
- [11] JUSTE, A, B THOMMA a B LIEVENS. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, issue 6, s. 745-761. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.009. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008000786>
- [12] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vyd. 1. V Brně: VUTIUM, 2007, xxv, 1176, 61, 31 s. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8
- [13] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 2., rozš. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1997, 270 s.
- [14] TANG, Y. W., PROCOP, G. W., PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry* [online]. 1997, no. 43 [cit. 2015-03-029]. Dostupný z WWW: <http://www.clinchem.org/cgi/content/full/43/11/2021>
- [15] VAN ELSAS, J.D. a F.G.H. BOERSMA. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*. 2011, vol. 47, issue 2, s. 77-87. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.11.010. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1164556310000993>
- [16] SAKATA, Shinji, Toshiki TONOOKA, Shinobu ISHIZEKI, Masaaki TAKADA, Mitsuo SAKAMOTO, Masafumi FUKUYAMA a Yoshimi BENNO. Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to Bifi-

- dobacterium species. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, vol. 243, issue 2, s. 417-423. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.01.002. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/j.femsle.2005.01.002>
- [17] SJÖBERG, Fei, Forough NOWROUZIAN, Ignacio RANGEL, Charles HANNOUN, Edward MOORE, Ingegerd ADLERBERTH a Agnes E. WOLD. Comparison between terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and quantitative culture for analysis of infants' gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods*. 2013, vol. 94, issue 1, s. 37-46. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770121300122X>
- [18] DAS, Surajit, HIRAK R. DASH, Neelam MANGWANI, Jaya CHAKRABORTY a Supriya KUMARI. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 2014, vol. 103, s. 80-100. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.05.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701214001353>
- [19] JUSTE, A, B THOMMA a B LIEVENS. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, issue 6, s. 745-761. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008000786>
- [20] RANTSIOU, Kalliopi a Luca COCOLIN. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, vol. 108, issue 2, s. 255-267. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160506000201>
- [21] COCOLIN, Luca, Valentina ALESSANDRIA, Paola DOLCI, Roberta GORRA a Kalliopi RANTSIOU. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, vol. 167, issue 1, s. 29-43. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160513002316>

- [22] QUIGLEY, Lisa, Orla O'SULLIVAN, Tom P. BERESFORD, R. Paul ROSS, Gerald F. FITZGERALD a Paul D. COTTER. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, vol. 150, 2-3, s. 81-94. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511004454>
- [23] ERCOLINI, Danilo, Giancarlo MOSCHETTI, Giuseppe BLAIOTTA a Salvatore COPPOLA. The Potential of a Polyphasic PCR-DGGE Approach in Evaluating Microbial Diversity of Natural Whey Cultures for Water-Buffalo Mozzarella Cheese Production: Bias of Culture-Dependent and Culture-Independent Analyses. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001, vol. 24, issue 4, s. 610-617. DOI: 10.1078/0723-2020-00076. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202004700752>
- [24] PANGALLO, Domenico, Nikoleta ŠAKOVÁ, Janka KOREŇOVÁ, Andrea PUŠKÁROVÁ, Lucia KRAKOVÁ, Lubomír VALÍK a Tomáš KUČHTA. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, vol. 170, s. 38-43. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051300487X>
- [25] FLEET, G. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 50, 1-2, s. 101-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00080-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816059900080X>
- [26] BARATA, A., M. MALFEITO-FERREIRA a V. LOUREIRO. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, vol. 153, issue 3, s. 243-259. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511006878>
- [27] RANDAZZO, Cinzia L., Angela RIBBERA, Iole PITINO, Flora V. ROMEO a Cinzia CAGGIA. Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*. 2012, vol. 32, issue 1, s. 87-96. DOI: 10.1016/j.fm.2012.04.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002012000950>

- [28] PAOLETTI, M. *Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs, and snails*. Enfield, (NH): Science Publishers, c2005, xiv, 648 p. ISBN 15-780-8339-7.
- [29] KLUNDER, H.C., J. WOLKERS-ROOIJACKERS, J.M. KORPELA a M.J.R. NOUT. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*. 2012, vol. 26, issue 2, s. 628-631. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.02.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512000874>
- [30] SHARMIN, Marufa, Prangan Das BANYA, Laboni PAUL, Fouzia Ferdows Khan CHOWDHURY, Sarah AFRIN, Mrityunjy ACHARJEE, Tasmina RAHMAN a Rashed NOOR. Study of microbial proliferation and the in vitro antibacterial traits of commonly available flowers in Dhaka Metropolis. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2015, vol. 5, issue 2, s. 91-97. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60634-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2222180814606344>
- [31] SUN, Yu, Linqing ZHAO, Meng ZHAO, Runan ZHU, Jie DENG, Fang WANG, Fan LI, Yaxin DING, Run TIAN a Yuan QIAN. Four DNA extraction methods used in loop-mediated isothermal amplification for rapid adenovirus detection. *Journal of Virological Methods*. 2014, vol. 204, s. 49-52. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093414001487>
- [32] HEYNDRICKX, M., L. VAUTERIN, P. VANDAMME, K. KERSTERS a P. DE VOS. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*. 1996, vol. 26, issue 3, s. 247-259. DOI: 10.1016/0167-7012(96)00916-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167701296009165>
- [33] TGGE MAXI Systém Instruction Manual Ver. 09/10 [on-line]. [cit. 2015-04-20]. Dostupný z WWW: http://www.biometra.de/files/themes/biometra_standard/pdfs/Manual_TGGE_MAXI_May_2012.pdf.
- [34] SINGLETON, Paul a Diana SAINSBURY. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. 3rd ed. rev. Chichester: John Wiley, 2006, 895 s. ISBN 04-700-3545-5.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CPM	celkový počet mikroorganismů
MPN	metoda pravděpodobného počtu
TGGE	gelová elektroforéza v teplotním gradientu
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce
T-RFLP	polymorfismus terminálních restrikčních fragmentů
rDNA	ribozomální DNA
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
ARDRA	restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA
qPCR	kvantitativní real-time PCR
bp	párů nukleotidů (base pair)

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1. Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované ze vzorků. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, M 1 kb marker. 32
- Obr. 2. ARDRA. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, A. *Hae III*, B. *EcoR I*, C. *Hind III*, M 100 bp DNA marker. 33
- Obr. 3. ARDRA. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, D. *Xho I*, E. *Hinf I*, A+E. *Hae III* + *Hinf I*, M. 100 bp DNA marker. 34
- Obr. 4. Použití restrikčních enzymů na amplifikovanou DNA. 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, A. *Hae III*, B. *EcoR I*, C. *Hind III*, D. *Xho I*, E. *Hinf I*, A+E. *Hae III* + *Hinf I*, M. 100 bp DNA marker. 34
- Obr. 5. 1. stupeň nested PCR s primery *fD1* a *rD1*. M. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, 1,0 kbp DNA marker. 37
- Obr. 6. 1. stupeň nested PCR s primery *341f* a *907r*. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, M. 1,0 kbp DNA marker. 37
- Obr. 7. 2. stupeň nested PCR. M. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, 1,0 kbp DNA marker. 38
- Obr. 8. TGGE analýza vzorků. 1. *Gryllus assimilis*, 2. *Bombyx mori* (houseska), 3. *Bombyx mori* (kukla), 4. *Galleria mellonella*, 5. *Escherichia coli*, 6. jedlý květ, K. negativní kontrola, M. 100 bp DNA standard 39

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Vzorky jedlého hmyzu použité pro molekulární stanovení.</i>	23
<i>Tab. 2. Přehled použitých primerů.</i>	24
<i>Tab. 3. Přehled použitých restrikčních enzymů.</i>	24
<i>Tab. 4. Složení směsi pro PCR.</i>	26
<i>Tab. 5. Průběh PCR a počet cyklů.</i>	27
<i>Tab. 6. Složení směsi pro 1. stupeň nested PCR.</i>	28
<i>Tab. 7. Průběh 1. stupně Nested PCR a počet cyklů.</i>	28
<i>Tab. 8. Složení směsi pro 2. stupeň nested PCR.</i>	29
<i>Tab. 9. Průběh 2. stupně nested PCR a počet cyklů.</i>	29