

ISSN 0009-0646

A

**24. KONGRES
ČESKOSLOVENSKÉ
SPOLEČNOSTI
MIKROBIOLOGICKÉ**

LIBEREC, 2. – 5. 10. 2007

ABSTRAKTY

**BULLETIN
ČESKOSLOVENSKÉ
SPOLEČNOSTI
MIKROBIOLOGICKÉ**

**ČESKOSLOVENSKÁ
SPOLEČNOST MIKROBIOLOGICKÁ**

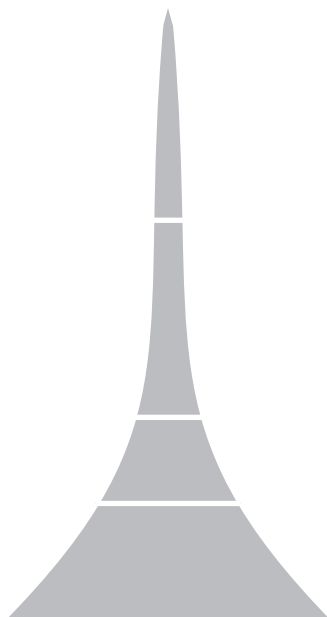
Ročník XXXXVIII

PRAHA – BRATISLAVA 2007

24. KONGRES
ČESKOSLOVENSKÉ SPOLEČNOSTI
MIKROBIOLOGICKÉ

PROGRAM A ABSTRAKTY

LIBEREC, 2. – 5. 10. 2007



ISSN 0009-0646, sborník sestavil Martin Pospíšek a Jiří Gabriel (Eds.)
Neprošlo ediční ani jazykovou úpravou. K tisku byly použity autorské originály.
Vydala *Československá společnost mikrobiologická*, Praha 2007, jako přílohu
Bulletinu Československé společnosti mikrobiologické **48**, 2007

Obsah

Výbory	5
Poděkování sponzorům	7
Časové schéma kongresu	9
Plenární přednášky	12
Přehled sekcí	12
Program sekcí	13
Abstrakty*	23
Antibiotika a rezistence	25
Mikrobiální biofilmy	46
Bioinformatika a genomika	59
Etiologie nových infekcí	63
Environmentální mikrobiologie	69
Fyziologie mikroorganismů	85
Imunologie a gnotobiologie	92
Lékařská mikrobiologie	107
Molekulární biologie	129
Mykologie	160
Potraviny a probiotika	169
Bioremediace a ekotoxikologie	201
Sbírky mikroorganismů	221
Veterinární mikrobiologie	229
Virologie	254
Mikrobiologie vody	285
Výuka mikrobiologie	298

* zkrácené názvy sekcí použité v záhlavích abstraktů

Organizační výbor

RNDr. Jiří Gabriel, DrSc., předseda
Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

RNDr. Martin Pospíšek, PhD., místopředseda
Přírodovědecká fakulta UK, Praha

Prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
Fakulta mechatroniky a mezioborových inženýrských studií TUL, Liberec

Prof. RNDr. Jaroslav Spížek, DrSc.
Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

MUDr. Dagmar Malotová
Laboratoř klinické mikrobiologie s.r.o., Šternberk

RNDr. Jiří Matějů, CSc.
Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

Renáta Fraňková
Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

Eva Čejková
Centrum Babylon, Liberec

Vědecký výbor

RNDr. Petr Baldrian, PhD., Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

RNDr. Dana Baudišová, PhD., Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha

Doc. Mgr. Luděk Bláha, PhD., Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Doc. Ing. Ivan Čiznár, DrSc., Fakulta veřejného zdravotnictví SZU, Bratislava

Prof. RNDr. Libor Ebringer, DrSc., Přírodovědecká fakulta UK, Bratislava

RNDr. Jiří Gabriel, DrSc., Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

Mgr. Renáta Kolínská, Státní zdravotní ústav, Praha

MUDr. Dagmar Malotová, Laboratoř klinické mikrobiologie s.r.o., Šternberk

RNDr. Jiří Matějů, CSc., Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

Mgr. Martin Mokrejš, PhD., Přírodovědecká fakulta UK, Praha

Prof. MVDr. Ivan Mikula, DrSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

RNDr. Jan Nešvera, CSc., Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

Ing. Elena Piecková, PhD., MPH, Vedeckovýskumná základňa SZU, Bratislava

RNDr. Martin Pospíšek, PhD., Přírodovědecká fakulta UK, Praha
MUDr. Gustáv Russ, DrSc., Virologický ústav SAV, Bratislava
MUDr. Filip Růžička, Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny, Brno
RNDr. Milan Seman, CSc., Přírodovědecká fakulta UK, Bratislava
Prof. RNDr. Jaroslav Spížek, DrSc., Mikrobiologický ústav AVČR, Praha
Prof. MUDr. Helena Tlaskalová-Hogenová, DrSc., Mikrobiologický ústav AVČR,
Praha
Prof. MUDr. Miroslav Votava, CSc., Mikrobiologický ústav LF MU a FN
u sv. Anny, Brno
MUDr. Helena Žemličková, PhD., Státní zdravotní ústav, Praha

Čestný výbor

Prof. RNDr. Václav Pačes, DrSc., předseda Akademie věd ČR, Praha
Prof. Ing. Štefan Luby, DrSc., Dr.h.c., předseda Slovenské akademie věd, Bratislava
Petr Skokan, hejtman Libereckého kraje
Ing. Jiří Kittner, primátor Statutárního města Liberec
RNDr. Martin Bilej, DrSc., ředitel Mikrobiologického ústavu AVČR
Prof. Ing. Vojtěch Konopa, CSc., rektor Technické univerzity v Liberci
Prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc., děkan fakulty Mechatroniky a mezioborových
inženýrských studií Technické univerzity v Liberci
MUDr. Pavla Křížová, CSc., předsedkyně Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP, Praha
MUDr. Josef Scharfen, CSc., předseda Společnosti pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP, Praha
Prof. MUDr. Miroslav Votava, CSc., koordinátor 23. Kongresu ČSSM, Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny, Brno
Doc. Ing. Ivan Čižnár, DrSc., předseda Československé společnosti mikrobiologické, Fakulta veřejného zdravotnictví SZU, Bratislava

Předsedové pracovních komisí Valné hromady ČSSM

MANDÁTOVÁ KOMISE

RNDr. Irena Lichá, CSc., Přírodovědecká fakulta UK, Praha

NÁVRHOVÁ KOMISE

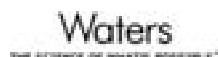
RNDr. Jiří Matějů, CSc., Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

VOLEBNÍ KOMISE

MVDr. Michaela Ziklová, Laboratoř klinické mikrobiologie s.r.o., Šternberk

Poděkování sponzorům

Organizační výbor děkuje všem uvedeným společnostem a organizacím za finanční podporu 24. Kongresu a další pomoc:



Na pořádání 24. Kongresu Československé společnosti mikrobiologické se dále podílely:



Česká lékařská společnost JEP a Technická univerzita v Liberci

Časové schéma kongresu

úterý 2.10.2007

RECEPCE HOTELU BABYLON

10:00–18:30 registrace účastníků

KONGRESOVÝ SÁL

15:00

slavnostní zahájení, uvítání hostů
předání diplomů Čestných členů ČSSM a Patočkových medailí
zahájení Valné hromady ČSSM
slavnostní přednáška – Stanislav Zadražil:
Kde jsou kořeny molekulární biologie?
přestávka
ukončení Valné hromady ČSSM

GOLD CLUB

19:30 neformální setkání účastníků s občerstvením

středa 3.10.2007

přestávky na kávu: 10:30–11:00 (sál Alfons Mucha)
16:00–17:00 (sál Alfons Mucha a Tropické atrium)
přestávka na oběd: 13:00–14:30 (Atriová restaurace)

KONGRESOVÝ SÁL

08:30 předání diplomů Kvach Family Prize a Švec Family Prize
08:30–10:30 plenární přednášky
11:00–13:00 sekce Lékařská mikrobiologie
14:30–16:00 sekce Potravinářská mikrobiologie a probiotika I

SÁL ALFONS MUCHA

09:00–17:30 prezentace sponzorujících firem

SÁL JOSEF MÁNES

11:00–13:00 sekce Imunologie a gnotobiologie
14:30–16:00 sekce Bioinformatika a genomika

SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

11:00–13:00 sekce Environmentální mikrobiologie
14:30–16:00 sekce Veterinární mikrobiologie I

SÁL EMIL FILLA
14:30–16:00 sekce Bioremediace a ekotoxikologie

TROPICKÉ ATRIUM
16:00–17:30 setkání u posterů I

DIVADLO F.X. ŠALDY
19:30 představení Cyrano z Bergeracu

čtvrtek 4.10.2007

přestávky na kávu: 10:30–11:00 (sál Alfons Mucha)
16:00–16:30 (sál Alfons Mucha)
přestávka na oběd: 13:00–14:30 (Atriová restaurace)

KONGRESOVÝ SÁL
08:30–10:30 plenární přednášky
11:00–13:00 sekce Molekulární biologie mikroorganismů I
14:30–16:00 sekce Virologie I
16:30–17:30 sekce Virologie II

SÁL ALFONS MUCHA
09:00–17:30 prezentace sponzorujících firem

SÁL JOSEF MÁNES
11:00–13:00 sekce Mikrobiologie vody
14:30–16:00 sekce Antimikrobiální látky a rezistence I
16:30–17:30 sekce Antimikrobiální látky a rezistence II

SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ
11:00–13:00 sekce Etiologie nových a zřídka se vyskytujících infekcí
14:30–16:00 sekce Veterinární mikrobiologie II
16:30–17:30 sekce Molekulární biologie mikroorganismů II

SÁL EMIL FILLA
11:00–13:00 sekce Mykologie
14:30–16:00 sekce Sběrky mikroorganismů I
16:30–17:30 sekce Mikrobiální biofilmy I

TROPICKÉ ATRIUM
17:30–19:00 setkání u posterů II

pátek 5.10.2007

SÁL ALFONS MUCHA

09:00–10:30 sekce Potravinářská mikrobiologie a probiotika II

SÁL JAN ZRZAVÝ

09:00–10:00 sekce Sbírký mikroorganismů II

SÁL JOSEF MÁNES

09:00–10:30 sekce Mikrobiální biofilmy II

SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

09:00–10:30 sekce Molekulární biologie mikroorganismů III

SÁL EMIL FILLA

09:00–10:30 sekce Výuka mikrobiologie

11:00

odjezd autobusu na exkurzi na přehradu Josefův Důl (celková délka exkurse včetně cesty cca 2,5 hodiny)

Plenární přednášky

středa 3.10.2007

- 8:30–9:00 **Luděk Bláha:** *Současný stav a nové trendy výzkumu a využití mikroorganismů v ekotoxikologii*
- 9:00–9:30 **Peter Šebo:** *Bakteriální toxiny: chytré, krásné, nebezpečné, užitečné...*
- 9:30–10:00 **Gustáv Russ:** *Virusy, ktoré v súčasnosti pútajú našu pozornosť*
- 10:00–10:30 **Marie Brůčková:** *Nové poznatky v diagnostice a epidemiologii HIV/AIDS*

čtvrtek 4.10.2007

- 8:30–9:00 **Karel Krovacek:** *Rare and new emerging enterobacterial pathogens*
- 9:00–9:30 **Ivan Mikula:** *Mutácie v génoch hostiteľa a mikrobiálna infekcia*
- 9:30–10:00 **Jaroslav Spížek:** *Potřebujeme nová antibiotika?*
- 10:00–10:30 **Julius Lukeš:** *Editování RNA u trypanosom*

Přehled sekcí a jejich odborných garantů

- Antimikrobiální látky a rezistence (J. Spížek)
- Bioinformatika a genomika (M. Mokrejš)
- Bioremediace a ekotoxikologie (L. Bláha)
- Environmentální mikrobiologie (P. Baldrian)
- Etiologie nových a zřídka se vyskytujících infekcí (I. Čiznár)
- Fyziologie mikroorganismů (J. Gabriel, M. Pospíšek)
- Imunologie a gnotobiologie (H. Tlaskalová-Hogenová)
- Lékařská mikrobiologie (D. Malotová)
- Mikrobiální biofilmy (F. Růžička)
- Mikrobiologie vody (D. Baudišová)
- Molekulární biologie mikroorganismů (J. Nešvera, M. Pospíšek)
- Mykologie (E. Piecková)
- Potravinářská mikrobiologie a probiotika (L. Ebringer)
- Sbírký mikroorganismů (R. Kolínská, H. Žemličková)
- Veterinární mikrobiologie (I. Mikula)
- Virologie (G. Russ)
- Výuka mikrobiologie (M. Votava)

Program sekcí

Antimikrobiální látky a rezistence (J. Spížek)

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL JOSEF MÁNES

14:30–16:00 sekce Antimikrobiální látky a rezistence I

Jaroslav Spížek: *stručný úvod*

Martina Macková: *Krátké peptidy s antimikrobiální aktivitou izolované z rostlin a hmyzu*

Monika Dolejská: *Koliformní bakterie rezistentní k antimikrobiálním látkám na mléčných farmách na Moravě*

Helena Hradecká: *Analýza R-plazmidů u Salmonella typhimurium*

Gabriela Novotná: *Rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminům u koaguláza negativních stafylokoků v ČR*

16:30 – 17:30 sekce Antimikrobiální látky a rezistence II

Stanislav Kadlčík: *Aktivace aminokyselinového prekurzoru při biosyntéze linkosamidových antibiotik linkomycinu a celesticetinu*

Markéta Koběrská: *Společné prvky shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu a jejich sprázení s anthramyciny*

Jitka Novotná: *Biosyntéza linkomycinu – další kamínky do mozaiky*

Bioinformatika a genomika (M. Mokrejš)

STŘEDA 3.10.2007, SÁL JOSEF MÁNES

14:30–16:00 sekce Bioinformatika a genomika

Martin Mokrejš: *A bioinformatical approach to analysis of viral and cellular internal ribosome entry sites (IRESs)*

Hynek Strnad: *Genom bakterie Rhodobacter capsulatus*

David Šmajš: *Genomová struktura spirochet rodu Treponema*

Bohdan Schneider: *PDB, Protein Data Bank, portal for structural biology*

Bioremediace a ekotoxikologie (L. Bláha)

STŘEDA 3.10.2007, SÁL EMIL FILLA

14:30–16:00 sekce Bioremediace a ekotoxikologie

Kateřina Malachová: *Mutagenicity bioassays for genotoxicity assessment of pyrometallurgical wastes*

Tomáš Macek: *Transformation of halogenated aromatics by plants and bacteria – consequences of plant-microbe interactions*

Jarmila Pazlarová: *Aerobní degradace tert-butyl(methyl)etheru (MTBE)*

Šárka Bidmanová: *Development of enzymatic biosensors for detection of halogenated environmental pollutants*

Jiří Mikeš: *Role exopolymerních látek v bioremediačních technologiích*

Environmentální mikrobiologie (P. Baldrian)

STŘEDA 3.10.2007, SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

11:00–13:00 sekce Environmentální mikrobiologie

Markéta Marečková: *Nové metody čištění DNA izolované z půdních vzorků*

Dana Elhottová: *Phospholipid fatty acid and phospholipid etherlipid fingerprints approach to describe complex soil microbial community under impact of cattle husbandry*

Petr Baldrian: *Prostorová a časová dynamika distribuce enzymových aktivit v lesních půdách ve vztahu k půdním houbám*

Ladislav Čermák: *Vliv antibiotika linkomycinu na bakteriální společenstvo v půdě*

Jitka Černošková: *Vliv vybraných pesticidů na nitrifikační a respirační aktivitu půdních mikroorganismů*

Dana Elhottová: *Charakteristika a role mikroflóry netopyřihy guana v ekologii jeskyně*

Etiologie nových a zřídka se vyskytujících infekcí (I. Čížnár)

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

11:00–13:00 sekce Etiologie nových a zřídka se vyskytujících infekcí

Dagmar Hulínská: *Implicated in human infectious endocarditis*

Renata Karpíšková: *Charakteristika izolátů Listeria monocytogenes v ČR*

Oto Melter: *Dog as a sentinel for human Anaplasma phagocytophilum infection*
Josef Prášek: *Výskyt Brachyspira pilosicoli u prasat a psů v České republice*
Josef Scharfen: *Diagnostika a léčba nokardiosy*

Imunologie a gnotobiologie (H. Tlaskalová-Hogenová)

STŘEDA 3.10.2007, SÁL JOSEF MÁNES

11:00–13:00 sekce Imunologie a gnotobiologie

Helena Tlaskalová-Hogenová: *Úvod – mikroflóra a imunitní systém*
Ivan Lefkovits: *Quantitative immunology – molecules and cells*
Martin Bilej: *Antimikrobiální peptidy u bezobratlých*
Hana Kozáková: *Effect of commensal microflora on the induction of mucosal tolerance to birch pollen allergen in BALB/c mice*
Radomíra Nemcová: *Využití gnotobiotického modelu zvierat pri štúdiu probiotických vlastností laktobacilov*
Rastislav Mucha: *Súvislosť mutácií TLR1 a TLR2 génov s vnímavosťou na MAP u hovädzieho dobytka*
Miloslav Kverka: *Porovnání bakteriálních populací u dvou skupin SPF myši s různým průběhem experimentální kolitidy pomocí analýzy genu pro 16S rRNA*

Lékařská mikrobiologie (D. Malotová)

STŘEDA 3.10.2007, KONGRESOVÝ SÁL

11:00–13:00 sekce Lékařská mikrobiologie

Petr Zdílna: *Problematika akreditací klinických mikrobiologických laboratoří*
Ivana Machová: *Epidemie puchýřnatého onemocnění novorozenců vyvolané kmeny Staphylococcus aureus*
Eva Chmelařová: *Hodnocení výskytu MRSA ve FN Ostrava*
Dagmar Malotová: *Klinický význam hemokultivace v praxi – rezervy, přehled a kasuistiky*
Alena Ševčíková: *Současné postavení hemokultur v diagnostice sepsé*
Barbora Žaloudíková: *Detekce klinicky významných bakterií v ortopedickém materiálu pomocí metody multiplex PCR*
Renáta Melková: *Proteinový profil izolátov Pseudomonas spp.*
Sabina Purkrťová: *Genotypizace kampylobakterů*
Ivanka Matoušková: *"Čisté prostory" (operační sály, ...) ve zdravotnických zařízeních*

Mikrobiální biofilmy (F. Růžička)

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL EMIL FILLA

16:30–17:30 sekce Mikrobiální biofilmy I

Martin Rulík: *Mikrobiální biofilmy v přírodním prostředí – současný stav poznání*

Filip Růžička: *Možnosti detekce biofilm pozitivních mikrobusů na základě jejich povrchových vlastností*

Jiří Gallo: *Infekce kloubní náhrady jako důsledek tvorby biofilmu na povrchu implantátu*

Veronika Holá: *Tvorba biofilmu u nozokomiálních kmenů Pseudomonas aeruginosa izolovaných z jednotek intenzivní péče FN u sv. Anny*

PÁTEK 5.10.2007, SÁL JOSEF MÁNES

9:00–10:30 sekce Mikrobiální biofilmy II

Pavel Čermák: *Produkce biofilmu – faktor virulence u kmenů izolovaných z infikovaných cévních katetrů*

Soňa Kucharíková: *Vplyv vybraných antifungálnych látok na hydrofóbnosť povrchu buniek a tvorbu biofilmu in vitro u Candida glabrata*

Marcela Malcová: *Morfologické typy terénnych kmenů Salmonella enterica sérovar Typhimurium a jejich vztah ke tvorbě biofilmu*

Mikrobiologie vody (D. Baudišová)

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL JOSEF MÁNES

11:00–13:00 sekce Mikrobiologie vody

Dana Baudišová: *Mikrobiální znečištění toku Lužická Nisa na našem území*

Markéta Chlupáčová: *Mikrobiologická kvalita balené vody čepované z watercoolerů stále aktuální*

Marianna Cíhová: *Výskyt a stanovenie rodu Legionella vo vzorkách vody*

Hana Mlejnková: *Diferenciace mikrobiálních společenstev znečištěných vod na základě jejich fylogenetické odlišnosti*

Zuzana Perháčová: *Thionové bakterie AMD vod v oblasti Banská Štiavnica – Šobov*

Alexandra Šimonovičová: *Akumulácia Cd, Cu, Cr(VI), Ni, Pb, Zn z vodného prostredia kmeňmi A. niger*

Molekulární biologie mikroorganismů (J. Nešvera, M. Pospíšek)

ČTVRTEK 4.10.2007, KONGRESOVÝ SÁL

11:00–13:00 sekce Molekulární biologie mikroorganismů I

Pavel Branny: *Funkční vztah mezi aktivitou Ser/Thr proteinkinas eukaryotního typu a virulencí patogenních mikroorganismů*

Marie Weiserová: *Characterization of a restriction modification system from the commensal Escherichia coli strain A0 34/86 (O83:K24:H31)*

Daniela Gregorová: *Význam ostrovů patogenicity u Salmonella enterica*

Jaroslav Weiser: *Proteomová analýza nízko- a vysoko-rezistentních klonů segregovaných z populace erytromycin-rezistentní Escherichia coli rostoucí v turbidostatu v přítomnosti antibiotika*

Juraj Krajčovič: *Stability and expression of nuclear and plastome encoded genes for plastid components during drug treatment in Euglena gracilis and Euglena longa*

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

16:30–17:30 sekce Molekulární biologie mikroorganismů II

Tomáš Mašek: *Perspektivy studia na čepičce nezávislé translace v kvasince Saccharomyces cerevisiae*

Jiří Mašín: *Membrane translocation of Bordetella adenylate cyclase toxin promotes calcium entry into CD11b+ J774A.1 macrophage cells*

PÁTEK 5.10.2007, SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

9:00–10:30 sekce Molekulární biologie mikroorganismů III

Kateřina Papežová: *Úloha genů ybgS a yeaG o neznámé funkci u Salmonella typhimurium*

Lenka Pilousová: *Charakteristika neobvyklého retron elementu u S. enteritidis*

Magdaléna Crhánová: *SdiA a nízké pH u Salmonella*

Blanka Vicenová: *Studium jaderné funkce interleukinu-1 alfa v kvasinkách*

Jiří Černý: *Regulace exprese genů BAS1 a RRN3 na translační úrovni*

Mykologie (E. Piecková)

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL EMIL FILLA

11:00–13:00 sekce Mykologie

Vladimír Havlíček: *Metabonomics of clinically important filamentous fungi*

Alena Tomšíková: *Současná diagnostika „farmářské plíce“*

Filip Růžička: *Testování účinnosti antifungálních prostředků na vegetativní formy saprofytických vláknitých mikromycet*

Elena Piecková: *Mikroskopické vláknité huby v obytných budovách na Slovensku*

Zuzana Kolláriková: *Mikroskopické vláknité huby na stavebných materiáloch*

Tomáš Větrovský: *Význam a obsahy některých dvojmocných kovů v plodnicích dřevokazných hub*

Jiří Dvořák: *Projekt Orlice – využití hub při studiu znečištění životního prostředí těžkými kovy v masivu Kralického sněžníku*

Potravinářská mikrobiologie a probiotika (L. Ebringer)

STŘEDA 3.10.2007, KONGRESOVÝ SÁL

14:30–16:00 sekce Potravinářská mikrobiologie a probiotika I

Libor Ebringer: *História probiotík*

Tomáš Kuchta: *Aktuálne trendy v rýchlej identifikácii patogénnych baktérií v potravinách použitím PCR*

Eliška Kovářiková: *Výběr potenciálních probiotik na základe fyziologických charakteristik in vitro*

Jana Chumchalová: *The inhibitory effect of Lactobacillus rhamnosus VT1 and Lactobacillus paracasei SF1 in infant milk- and cereal-based formula*

Eva Tománková: *Testování antimikrobiální aktivity bifidobaktérií*

PÁTEK 5.10.2007, SÁL ALFONS MUCHA

9:00–10:30 sekce Potravinářská mikrobiologie a probiotika II

Lubomír Valík: *Inhibičný potenciál baktérií mliečneho kysnutia: kvantitatívna analýza interakcií s potravinársky nežiadúcimi baktériami*

Markéta Landová: *Vývoj DNA čipů pro detekci patogenů přenášených potravinami*

Štěpán Tůma: *Antiklostridiální potenciál baktérií Lactobacillus paracasei vyskytujících se v polotvrdých sýrech*

Dagmar Mudroňová: *Vplyv zinku na interakcie probiotických laktobacilov a patogénov*

Sbírky mikroorganizmů (R. Kolínská, H. Žemličková)

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL EMIL FILLA

14:30–16:00 sekce Sbírky mikroorganizmů I

David Novotný: *National programme of protection of genetic resources of economically significant microorganisms and tiny animals*

Vladislav Jakubů: *Webová a interní podoba databáze Sbírky mikroorganizmů CNCTC*

Josef Scharfen: *Polyfázová identifikace nokardií*

Monika Laichmanová: *Novinky v nabídce kontrolních kmenů České sbírky mikroorganizmů*

PÁTEK 5.10.2007, SÁL JAN ZRZAVÝ

09:00–10:00 sekce Sbírky mikroorganizmů II

Miroslav Kolařík: *Studium biodiverzity hub ve Sbírcce kultur hub a MBÚ AVČR a další využití získaných kmenů*

Vladimír Erban: *Lyofilizace z pohledu konzervace kultur*

Veterinární mikrobiologie (I. Mikula)

STŘEDA 3.10.2007, SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

14:30–16:00 sekce Veterinární mikrobiologie I

Mangesh Bhide: *Interaction between alternative complement pathway and bacterial pathogens: special reference to borreliae and streptococci*

Ivan Rychlík: *Multiplex PCR pro detailní charakteristiku Salmonella enterica serovar Typhimurium*

Anna Němcová: *Archaeal community of cattle digestive system*

Mangesh Bhide: *Toll-like receptors 1, 2 and 4: possible markers of natural resistance against mastitis?*

ČTVRTEK 4.10.2007, SÁL MIKOLÁŠ ALEŠ

14:30–16:00 sekce Veterinární mikrobiologie II

- Monika Dolejská: *Výskyt izolátů Escherichia coli rezistentních k antimikrobiálním látkám a salmonel u havranů polních zimujících v České republice*
- František Šišák: *Diagnostika salmonelových infekcí v chovech prasat sérologickým testem ELISA a kultivací*
- František Šišák: *Výskyt antibiotické rezistence u sérovarů Salmonella spp. izolovaných z aviárních zdrojů*
- Martina Šmehilová: *Použití metody FISH při stanovení bakterií trávicího traktu kojcenců a mláďat prežvýavců*

Virologie (G. Russ)

ČTVRTEK 4.10.2007, KONGRESOVÝ SÁL

14:30–16:00 sekce Virologie I

- Daniel Růžek: *Molekulární patogeneze klíšťové encefalitidy*
- Ludmila Prokešová: *Systémová a slizniční imunitní odpověď proti chřipkovému viru*
- Eva Varečková: *Antibodies induced by the light chain of influenza A haemagglutinin moderate the course of in vivo influenza infection*
- Ingrid Krejnová: *Infekcia vírusom chřipky typu A indukuje protilátky specifické pre PB1-F2 proteín*

ČTVRTEK 4.10.2007, KONGRESOVÝ SÁL

16:30–17:30 sekce Virologie II

- Šárka Nemečková: *Factory virulence viru vakcinie a jejich role při indukci buněčné imunity*
- Július Rajčáni: *Príprava fúzných proteínov kódovaných vírusom herpes simplex 1 a testovanie ich imunogenity z pohľadu prípravy rekombinantnej vakcíny*
- Jela Mistríková: *Súčasná možnosti využitia myšacieho modelu pre štúdium patogenézy ľudských gamaherpesvírusov*

Výuka mikrobiologie (M. Votava)

PÁTEK 5.2.2007, SÁL EMIL FILLA

9:00–10:30 sekce Výuka mikrobiologie

Emil Pavlík: *První zkušenosti z výuky mikrobiologie oboru zubní lékařství na 1. lékařské fakultě UK v Praze*

Jana Matějková: *Výuka mikrobiologie na 2. lékařské fakultě UK v Praze*

Marek Bednář: *Výuka mikrobiologie na 3. lékařské fakultě UK v Praze*

Karel Fajfrlík: *Mikrobiologie na LF v Plzni pro obor Zubní lékařství*

Olga Ryšková: *Výuka lékařské mikrobiologie pro studující Zubního lékařství na Lékařské fakultě UK v Hradci Králové*

Leonard Siegfried: *Skúsenosti s výučbou mikrobiológie pre poslucháčov všeobecného lekárstva a zubného lekárstva na LF UPJŠ v Košiciach*

Milan Kolář: *Problematika výuky mikrobiologie v rámci programu zubního lékařství na LF UP Olomouc*

Veronika Holá: *Lékařská mikrobiologie ve výuce studijního směru Zubní lékařství na LF MU*

Vladana Woznicová: *První rok výuky orální mikrobiologie na LF MU v Brně*

Libuše Kolářová: *Specializační vzdělávání lékařů a jiných odborných VŠ pracovníků v oboru lékařská mikrobiologie*

Miroslav Votava: *Výuka lékařské mikrobiologie – shrnutí*

ABSTRAKTY

Koliformní bakterie rezistentní k antimikrobiálním látkám na mléčných farmách na Moravě

Dolejská M. (1), Čížek A. (2), Novotná R. (3), Haas D. (4), Vyskočil M. (5)

(1) Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, (2) Ústav mikrobiologie a imunologie, (3) Klinika chorob psů a koček, (4) Ústav infekčních chorob a epizootologie, (5) Ústav genetiky, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého 1-3, 612 42 Brno

V chovech hospodářských zvířat jsou intenzivně používané antimikrobiální látky pro terapii a profylaxi infekcí, jejichž nežádoucím důsledkem je selekce rezistentních bakterií. Prostřednictvím potravinových produktů živočišného původu se mohou šířit ke člověku a představovat závažný problém při terapii infekcí. Cílem studie bylo zjistit výskyt koliformních bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám a Shiga toxigenní *Escherichia coli* O157 (STEC O157) na 192 mléčných farmách na Moravě a zhodnotit vliv faktorů chovu na výskyt rezistence. Z mléčných filtrů byly izolovány koliformní bakterie kultivací na agar s eozinem a metylénovou modří (Oxoid, VB) a STEC O157 imunomagnetickou separací (DynaL, Norsko). Diskovou difuzní metodou byla stanovena citlivost k 12 antimikrobiálním látkám. U rezistentních izolátů byla testována produkce inducibilní betalaktamázy a přítomnost genů antimikrobiální rezistence včetně integronů. Rezistence k antimikrobiálním látkám byla zjištěna u 47 % izolátů. Izoláty Shiga toxigenní *E. coli* O157 byly nalezeny ve 2 % mléčných filtrů. Při analýze faktorů chovu bylo prokázáno, že výskyt izolátů rezistentních k antimikrobiálním látkám je signifikantně vyšší ($P < 0,001$) ve velkých chovech. Antimikrobiální terapie mastitid u dojníc v období zapařlosti významně ovlivnila výskyt koliformních bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám. Řešeno s podporou grantu 525/00/0666 GAČR.

Analýza R-plazmidů u *Salmonella typhimurium*

Hradecká H., Rychlík I.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství Hudcova 70 621 00 Brno

Jako R-plazmidy jsou označovány vysokomolekulární plazmidy, které kódují rezistenci k více antibiotikům zároveň. Mezi jejich vlastnosti patří také schopnost přenášet se konjugací a šířit se nejen v rámci určitého bakteriálního druhu, ale i ve vyšších taxonomických jednotkách. Tato práce byla zaměřena na studium mobility genetických determinant rezistence k antibiotikům prostřednictvím R-plazmidů u souboru 24 multirezistentních kmenů *S. Typhimurium*. U kmenů byl pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) stanoven plazmidový profil a kmeny byly podrobeny konjugačním experimentům. Ke konjugačnímu přenosu docházelo u 12 kmenů a u všech testovaných kmenů převládal společný přenos rezistentního fenotypu. U 2 kmenů jsme v průběhu konjugačního procesu zaznamenali ztrátu některých determinant rezistence. K tomuto nekompletnímu transferu docházelo v přibližně 10 % konjugací a nejmenší stabilitu vykazovaly geny *tetA* a *blaTEM*, kódující rezistenci k tetracyklinu a ampicilinu. Ztráta oblastí zodpovídající za rezistenci k tetracyklinu odpovídala úseku plazmidové DNA o velikosti přibližně 10 kb a ztráta oblastí pro rezistenci k tetracyklinu a zároveň k ampicilinu pak úseku o velikosti 25 kb. U kmenů s deletovanou oblastí pro rezistenci k tetracyklinu jsme také pozorovali netypickou fúzi s plazmidem virulence (pSLT).

Activation of amino-acid precursor in biosynthesis of lincosamide antibiotics lincomycin and celesticetin

Kadlčík S., Chalupská D., Koběřská M., Kopecký J., Janata J.

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic Email: kadlcik.s@seznam.cz

Lincosamide antibiotics are built from an amino-acid and an aminosugar precursor. Coupling of both precursors in producing streptomycetes is probably catalysed by multienzyme complex of nonidentical subunits. Character of these subunits have not yet been fully identified. The most understood native lincosamide lincomycin, product of *Streptomyces lincolnensis*, comprise amino-acid moiety 4-propyl proline (PPL). It has been proposed, that protein LmbC is input subunit of the supposed lincomycine specific multienzyme complex. LmbC selects and activates PPL by adenylation, however LmbC also exhibits minor adenylation activity to proline. Amino-acid moiety of another lincosamide celesticetin, which is produced by *Streptomyces caelestis*, is proline. Protein CcbC homologous to the LmbC selects and activates proline, but is completely unable to activate PPL. It probably reflects evolution of the unique PPL activating protein LmbC from an ancestor activating ubiquitous substrate proline.

Společné prvky shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu a jejich spřažení s anthramyciny

Koběrská M., Kadlčík S., Ulanová D., Kopecký J., Novotná J., Jelínková M., Čermák L., Janata J.

Mikrobiologický ústav AVČR Vídeňská 1083 Praha 4 142 20

Linkosamidová antibiotika linkomycin a celesticetin mají společnou část biosyntézy. Pomocí sond ze známé sekvence shluku genů pro biosyntézu linkomycinu byl izolován a osekvenován shluk pro biosyntézu celesticetinu ze *Streptomyces caelestis* ATCC 14294. Celkem byl osekvenován fragment dlouhý 35 141 bp obsahující 33 otevřených čtecích rámců, z nichž 23 kóduje biosyntézu celesticetinu. Na okraji shluku je gen *ccrB* pro rRNA methyltransferasu udílející produkčnímu kmenu rezistenci vůči syntetizovanému antibiotiku. Přítomnost pseudogenů kódujících transposasy a integrasu v bezprostředním okolí na obou stranách shluku svědčí jeho o horizontálním přenosu v průběhu evoluce. Společné kroky v biosyntéze linkomycinu a celesticetinu kóduje celkem 19 genů, jejichž analogy jsou přítomny v obou producentech. Celesticetinový shluk zahrnuje i pět genů specifických, tedy pravděpodobně kódujících syntézu a připojení salicylátové podjednotky. Naopak průnik biosyntézy linkomycinu s anthramyciny reflektuje šestice homologních genů kódujících enzymy katalyzující přeměnu L-tyrosinu na propyl-L-prolin.

Krátké peptidy s antimikrobiální aktivitou izolované z rostlin a hmyzu

Macková M. (1,2), Doležilková I. (1, 2), Neubauerová T. (1, 2), Ciencialová A. (2), Jiráček J. (2), Koutek B. (2) a Macek T. (1, 2)

(1) Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 3, 166 28, Prague, CZ; (2) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, Flemingovo n. 2, Prague, 166 10, CZ

Insects and plants possess defense systems to block the entry of microbial invaders. Several molecules contribute to defense activity including proteins or peptides, such as lectins, chitinases, proteases, defensins, ubiquitin-like, arginine- and glutamate-rich peptides. Antimicrobial peptides (AP) constitute a heterogeneous class of low molecular mass proteins. They exhibit broad-spectrum activity against bacteria, protozoa, fungi and viruses. The largest group of AP is that of cationic molecules. They have direct antimicrobial activity and it has become evident that they have function in modulating immunity. AP are generally 12-50 amino acids in length and have a net positive charge. They fold, owing to the presence of disulphide bridges or contact with membranes, into three-dimensional amphiphilic structures. The formation of ion channels and transmembrane pores eventually leads to the lysis of microbial cells. However, these effects are not the only mechanisms of microbial killing. The aim of this study is isolation and characterization of substances with antimicrobial activity from plants and insect *Neobelliera bullata*. AP were isolated by precipitation of fractions and separated by RP-HPLC and then characterized by UV-VIS spectroscopy, SDS-PAGE electrophoresis and mass spectrometry. Antimicrobial and antifungal activity was tested using bacterial strains G-, G+ bacteria and fungi. Acknowledgement: The work was sponsored by GACR 203/05/0832 and FRVS G4/1676/2007

Rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminům u koaguláza negativních stafylokoků v ČR

Novotná G., Janata J.

Laboratoř biologie sekundárního metabolismu, Mikrobiologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, Praha, Česká Republika

Mezi devadesáti osmi izoláty koaguláza negativních stafylokoků izolovaných z českých nemocnic (rezistentních k methicilinu a navíc k makrolidům a/nebo linkosamidům) byla zjištěna neobvykle vysoká frekvence genů udělejících rezistenci pouze k jednotlivým členům obvykle rezistenčně propojené skupiny antibiotik MLSB (makrolidylinkosamidy-streptograminy B). Navíc u deseti klonálně příbuzných kmenů *Staphylococcus haemolyticus* byl nalezen nový LC fenotyp (rezistence k linkomycinu a klindamycinu, avšak citlivost k makrolidům), který naznačuje přítomnost u stafylokoků zcela nové genetické determinanty. U všech kmenů této skupiny byl identifikován a sekvenován nový gen vysoce podobný rezistenčnímu genu *vga(A)* popsanému u stafylokoků. O genu *vga(A)* se dosud mělo za to, že uděluje významnou rezistenci vůči streptograminům A, avšak pouze prahovou vůči linkosamidům. České izoláty s genem nazvaným *vga(A)LC* jsou však vysoce rezistentní vůči oběma skupinám strukturně odlišných antibiotik. Geny *vga(A)LC* i *vga(A)* i jejich modifikované formy byly přeneseny do citlivého kmene *Staphylococcus aureus* a tam byl prokázán význam specifických aminokyselinových zbytků pro stupeň rezistence vůči oběma strukturně odlišným skupinám látek.

Biosyntéza linkomycinu – další kamínky do mozaiky

Novotná J. (1), Olšovská J. (1), Smutná Y. (1), Novák P. (1), Marečková M. (1), Mojžeš P. (2), Spížek J. (1) a Janata J. (1)

(1) Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha, Česká republika; (2) Fyzikální ústav, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika

Linkomycin a jeho derivát klindamycin jsou důležitá antibiotika. používaná v humánní i veterinární medicíně. Molekula linkomycinu je tvořena dvěma amidově vázanými subjednotkami, methylpropylprolinem (methylPPL) a methylthiolinkosamidem. Biosyntetická dráha vedoucí z TYR k PPL byla na základě určení biosyntetického původu C a N atomů navržena pouze v hrubých rysech. Linkomycinový biosyntetický shluk genů *Streptomyces lincolnensis* obsahuje 26 ORF s předpokládanými biosyntetickými (lmb) funkcemi. Komparativní analýza sekvence shluku odhalila, že lmbA, lmbB1, lmbB2, lmbX, lmbW a lmbY mají své homology mezi geny antramycinového biosyntetického shluku. Antramycin sdílí s linkomycinem počáteční kroky biosyntézy PPL derivátů a vzájemně homologní proteiny nejspíše katalyzují tyto reakce. Katalýza prvních dvou reakcí biosyntézy PPL (konverze TYR a DOPA na neidentifikovaný žlutý produkt) byly připsány LmbB1 a LmbB2. LmbB1 je dioxygenáza, štěpící aromatický kruh DOPA. V této práci byl LmbB2 nadprodukován v *E. coli*, purifikován a charakterizován. Reakční produkt LmbB2, který vykazoval retenční čas totožný se standardem DOPA, byl purifikován a HR-MS charakterizován. SERRS spektra LmbB2 naznačují, že prostetickou skupinou LmbB2 je hem. Tetrahydrobiopterin zvyšuje aktivitu LmbB2 čtyřikrát. LmbB2 je tedy monooxygenáza katalyzující hydroxylaci TYR na DOPA. lmbA, lmbW, lmbX a lmbY byly inkubovány pomocí systému REDIRECT a odpovídající inaktivanty byly použity v obohacovacích experimentech.

Potřebujeme nová antibiotika?

Spížek J., Janata J., Kopecký J., Novotná J.

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká Republika

Když byla antibiotika poprvé zavedena do klinické praxe, byla pokládána za zázračné látky. Následoval dramatický pokles výskytu infekčních onemocnění a úmrtnosti. Během posledních desetiletí však pozorujeme stejně dramatický vzestup rezistence vůči antibiotikům a některé infekce je stále obtížnější léčit. Výskyt rezistentních kmenů bakterií se původně vůbec neočekával a byl výsledkem řady genetických změn. I když nyní existují kmene bakterií, které jsou rezistentní k většině antibiotik, jsou ještě pořád v menšině. Většina bakterií je dosud citlivá alespoň k některým antibiotikům. Kdybychom byli před léty zastavili vývoj nových antibiotik, neměli bychom peniciliny a cefalosporiny druhé a třetí generace a měli bychom nyní ještě mnohem vážnější problémy než máme. Domníváme se proto, že je třeba dále hledat nové přírodní i chemicky syntetizované antimikrobiální látky. Při výzkumu nových antimikrobiálních látek se nyní používá několik přístupů. Hledají se nová zásahová místa v patogenních bakteriích na základě sekvenování jejich genomu, zkoumají se noví producenti biologicky aktivních látek včetně nekultivovatelných druhů, připravují se nové hybridní látky a používá se chemická transformace a biotransformace s celými buňkami nebo izolovanými enzymy. Znalosti o genových klastrech specifických biosyntézu antibiotik umožňují připravovat nová antibiotika a nové deriváty známých antibiotik s lepší biologickou aktivitou nebo se zlepšenými farmakologickými vlastnostmi.

Molecular study of ter genes essential for tellurite resistance of Escherichia coli

Alekhina O., Valková D., Valkovičová L. and Turňa J.

Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynska dolina 1, 841 15 Bratislava, Slovakia

The determinant of tellurite resistance has been found in relatively wide spectrum of human pathogens. It has been described in *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and enterobacteriaceae like *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp. and *Escherichia coli*. Recently it has been found and described also on chromosome of haemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, the emergent human pathogen, as a novel pathogenicity island called TAI (Tarr et al. 2000). We have studied the clinical isolate KL53, encompassing ter determinant on a large conjugative plasmid pTE53 (Vavrova et al., 2006) previously and determined genes terBCDE to be essential for the resistance higher than 1024mg/ml potassium tellurite in LB medium (Kormutakova et al., 2000).. We have expressed these 4 essential genes in the pET28a+/BL21 expression system and proved the biological function of expressed proteins on corresponding gene deletants of minimal TeR in vitro clone pLK18 (Burian et al. 1998). Bioinformatic analysis together with the real in vivo expression shown by SDS-PAGE, proved the expression of terBCDE genes into the functional proteins. However, the genes and their gene products are known to be essential, thus far the mechanism of tellurite resistance of *E. coli* still remains unclear, but with the promising results given above we hope to uncover its secret soon.

Biologická aktivita nových fenamátových komplexov s atómom kovu v molekule

Hudecová D. (1), Krupková L. (1), Kaliňáková B. (1), Ondrušová Z. (1), Olejníková P. (1), Melník M. (2)

(1) *Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia*, (2) *Oddelenie anorganickej chémie, Ústav anorganickej chémie, technológie a materiálov, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR*

Skutočnosť, že viaceré kationy kovov sa aktívne zúčastňujú biologických reakcií nás podnietila študovať interakcie fenamátových zlúčenín s kovmi. Vznikom metalokomplexu sú často vytvorené podmienky pre transport farmakofora v organizme, zníži sa toxicita iónu kovu a obyčajne sa zvyšuje biologická aktivita metalokomplexu. S cieľom rozšíriť poznatky o biologickej aktivite fenamátov, predstavujúcich druhú generáciu nesteroidných antiflogistík, boli pripravené metalofenamáty všeobecného vzorca MX_2 , M = kovový ión (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}), X = anión kyseliny niflumovej, flufenamovej, mefánovej, tolfemovej, meclofenovej. Charakterizovali sme antimikróbnu aktivitu pomocou hodnôt IC_{50} a MIC na baktériách, kvasinkách a mycéliových hubách. Pri vybraných zlúčeninách sme stanovili potenciálnu mutagénnu, antioxidačnú, protizápalovú aktivitu a účinok na permeabilitu biologických membrán. Zavedenie iónov Zn^{2+} a Co^{2+} do molekuly fenamátov vo väčšine prípadov prehĺbilo inhibičný účinok komplexov na mikroorganizmy a zároveň potencovalo poškodenie biologických membrán sprevádzané efluxom antokyanov z červenej repy, hemoglobínu z erytrocytov a proteínov z buniek kvasiniek. Zlúčeniny s najvyššou antimikróbnou aktivitou $Co(tolf)_2 \cdot H_2O$ a $Co(fluf)_2 \cdot (H_2O)_4$ nemajú mutagénnu aktivitu. Metalofenamáty disponujú slabou antioxidačnou aktivitou. Prítomnosť Cu^{2+} v molekule fenamátov prehĺbila inhibíciu aktivity enzýmu LOX. Práca vznikla s podporou grantov VEGA č. 1/325/06, č. 1/2452, APVT-20-005504

Antimicrobial properties of metabolite extract obtained from lignite fungus - isolate 9b – Epicoccum sp.

Ondrušová Z., Varečka L., Hudecová D.

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia

Microbes produce low-molar-mass secondary metabolites exhibiting different biological activities, possessing original and unexpected structures. For many years efforts in isolating and screening microbes, appeared to concentrate on the examination of the more readily isolatable fungi and actinomycetes. In the recent years, interesting products have also been obtained from microbes growing in extreme conditions. Isolate 9b - *Epicoccum* sp., described in this work, was isolated under sterile conditions excluding air and soil contamination from lignite coal-mine Záhorie and was identified by its ITS sequences and morphological criteria. Our aim was to obtain and compare metabolite profile of this lignite fungal strain and its related recent specie *Epicoccum nigrum* CCM F-185 and also to evaluate the antimicrobial activities of isolated metabolites against bacteria, yeasts and filamentous fungi. To obtain metabolite profiles the qualitative analysis of fungi metabolites was carried out by thin-layer chromatography. The disc-diffusion method and micro-dilution method were used to determine antimicrobial activity. Metabolites produced by isolate 9b - *Epicoccum* sp. showed the antibacterial effect against G+ bacteria. Among the fungi *M. gypseum* and *T. interdigitale* were susceptible to this extract. To specify the active compounds we used bioautography and found out Rf values of bioactive blots. This work was supported by the Slovak Grant Agency VEGA, grant No. 1/325/06

In vitro sledovanie inhibičného účinku rastlinných esenciálnych olejov voči rôznym bakteriálnym kmeňom

Kočšová J., Hajdučková V., Mudroňová D., Nemcová R.

Ústav gnotobiológie a prevencie chorôb mláďat, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

Esenciálne oleje alebo silice sú jednou z biologicky aktívnych látok zastúpených v rastlinách a zodpovedajú hlavne za ich antibakteriálne účinky. V našej štúdií sme sa v in vitro podmienkach zamerali na sledovanie antibakteriálnej aktivity rôznych rastlinných esenciálnych olejov voči viacerým bakteriálnym kmeňom. Na testovanie sme zvolili dve metódy, a to diskovú agarovú metódu, ktorou sme stanovovali inhibičnú aktivitu meraním veľkosti vzniknutých inhibičných zón a metódu stanovenia minimálnych inhibičných koncentrácií. Inhibičný účinok bol testovaný u nasledovných esenciálnych olejov: oregano, tymián, šalvia, rozmarín, rasca, aníz, fenikel, rumanček, klinček a čajovníkový olej. Z bakteriálnych kmeňov boli použité grampozitívne aj gramnegatívne bakteriálne kmene (*Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Escherichia coli* a tiež *Lactobacillus*). Rastlinné esenciálne oleje vykazovali pri oboch metódach inhibičnú aktivitu, pričom najsilnejšie sa prejavovali oreganová a tymiánová silica, menej šalviová, rozmarínová, anízová a ďalšie. Testované esenciálne oleje, ktoré sa prejavili výraznejšími antibakteriálnymi účinkami voči viacerým patogénnym kmeňom, predstavujú do budúcnosti vhodnú alternatívu antibiotikám a iným syntetickým látkam, používaným vo veľkej miere v poľnohospodárstve. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-20-062505.

Molekulární analýza plazmidů kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k meticilinu

Kuntová L.(1), Doškař J.(1), Pantůček R.(1), Růžičková V.(1), Petráš P. (2)

(1) Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie, Brno, CZ; (2) Referenční laboratoř pro stafylokoky, Státní zdravotnický ústav, Praha.

Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je závažný lidský patogen způsobující různé druhy infekcí až po život ohrožující sepsi. Většina kmenů MRSA je multirezistentní, přičemž řada genů zodpovědných za rezistenci k antibiotikům jsou lokalizovány na plazmidech. Cílem práce byla bližší charakterizace plazmidů u 45 kmenů MRSA izolovaných z popáleninového oddělení FN Brno–Bohunice. Plazmidy byly nalezeny u 38 (84 %) kmenů, přičemž u 19 izolátů byl přítomen více než jeden typ plazmidu. Ve studovaném souboru kmenů bylo určeno 11 různých typů plazmidů o velikosti v rozmezí od 1 do několika desítek kbp. Restrikční analýza plazmidové DNA vedla k rozdělení studovaného souboru kmenů celkem do 12 skupin. Blíže byly charakterizovány čtyři plazmidy, na kterých byly stanoveny následující geny rezistence: gen *bla_Z* (β-laktamová antibiotika), gen *aacA-aphD* (gentamicin), gen *ermC* (MLS_B antibiotika), gen *cat* (chloramfenikol) a dále sekvence pro místně specifickou rekombinaci RSA a RSB. Přítomnost RSB indikuje možnost přenosu plazmidu transdukujícím fágem, což ukazuje na možnost mezidruhového přenosu. Výsledky budou využity pro poznání struktury a evoluce mobilních elementů a jejich interakcí v rámci genomu hostitelských kmenů.

Different post-translation processing of penicillin G acylase in bacterial and yeast hosts

Marková Z., Marešová H., Kyslík P.

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i. Vídeňská 1083 142 20 Praha 4

Penicillin G acylase (PGA) is an important industrial enzyme used for the production of semi-synthetic β -lactam antibiotics derived from key precursors 6-APA and 7-ADCA. Different high-expression recombinant systems have been developed. The amount of the enzyme in the production strain *Escherichia coli* RE3(pKA18) in which the cloned gene is expressed constitutively from a strong promoter, forms about 7% of the total cell protein (a specific activity of 800 U/ g cdw). Intracellular, methanol-inducible expression of bacterial PGA in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* X33(pPIC-PA1) reached lower level corresponding to specific activity of 330 U/ g cdw. The enzymes from both recombinant host strains were purified and further characterized. It was found that purified enzyme from the yeast retains only 50% of the activity of that purified from bacterium. The reduction of activity of PGA in *P. pastoris* is caused by different post-translational processing.

Utilizácia, analýza mastných kyselín a produkcia cytotoxických metabolitov izolátom aktinomycét z *Taxus baccata*

Maruna M., Šturdíková M., Čertík M.

Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

Výskum protirakovinových látok z rastlinných zdrojov viedol k objaveniu niekoľkých fytochemikálií s cytotoxickou aktivitou vrátane taxánov, avšak ich podiel v týchto rastlinách je veľmi nízky. Taxol, látka zavedená do klinickej praxe na liečbu rakoviny, bol izolovaný pôvodne z ihličnanu *Taxus brevifolia*. Práca bola zameraná na optimalizáciu kultivačných podmienok vhodných pre rast kmeňa aktinomycét izolovaného z *Taxus baccata* a produkciu jeho cytotoxických metabolitov. Substráty s rôznym zložením a obsahom mastných kyselín mohli ovplyvniť začiatok biosyntetickej dráhy týchto metabolitov a prispieť k zvýšeniu výťažkov finálnych diterpénových produktov. Aplikáciou piatich druhov olejov do mikrobiálnych kultúr v počiatočnom štádiu rastu izolátu bolo pozorované zvýšenie hladiny metabolitov s charakteristikami taxolu v niektorých vzorkách porovnaním s kultúrou bez olejového doplnku. Analyzované boli mastné kyseliny lipidov biomasy a extraktu kultúry po aplikácii vybraných látok, ktoré stimulovali produkciu taxánových metabolitov. Získané výsledky poukazovali na zmeny obsahu niektorých mastných kyselín účinkom stimulačných látok. Zvýšil sa podiel kyseliny steárovej a izosteárovej po aplikácii metyljasmonátu. Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín sa v analyzovaných vzorkách lipidov biomasy nezmenilo. Kyselina izopalmitová, palmítová a antiizopentánová boli stanovené ako majoritné mastné kyseliny biomasy produkčného kmeňa.

Evaluation of antibacterial effects of intercalated montmorillonite

Malachová K. (1), Pavlíčková Z. (1), Praus P. (2), Turicová M. (2)

(1) Department of Biology and Ecology, University of Ostrava, Dvořákova 7, 701 03 Ostrava, Czech Republic (2) Department of Analytical Chemistry and Material Testing VSB-Technical University Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava, Czech Republic

The evaluation of antibacterial effects of montmorillonite and its four intercalates with cetylpyridinium (MMT-CP), cetyltrimethylammonium (MMT-CTA), silver cation

(MMT-Ag+) and metal silver (MMT-Ag) showed that pure, unmodified MMT, had no antibacterial effects. MMT-CP and MMT-CTA exhibited the biggest antibacterial effect after three hours of action. After a 24-hour incubation, however, both intercalates were inefficient, likely because the surface of MMT was covered with a thick layer of bacteria, and therefore the effective compound could not affect the remaining microorganisms. After 2-hour and 3-hour incubations, the antibacterial effects of MMT-Ag+ and MMT-Ag were similar to those of MMT-CP and MMT-CTA but after a 24-hour incubation, a significant difference was observed in the case of MMT-Ag+. Consequently, the use of intercalated MMT-Ag+ for disinfection seems to be promising for other investigations, e.g., in the area of water disinfection technology. Keywords: Antibacterial effects, montmorillonite, Escherichia coli, Enterococcus faecium, cationic surfactants, silver, intercalation.

Srovnávací proteomová studie adaptace populace *Escherichia coli* resistantní k erytromycinu při dlouhodobé kultivaci v turbidostatu v přítomnosti a nepřítomnosti antibiotika

Petráčková D., Kalachová L., Techniková Z., Bezoušková S., Janeček J., Weiser J.

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

V uplynulém desetiletí došlo k alarmujícímu vzrůstu rezistence na antibiotika díky jejich nadužívání u řady patogenních bakterií. V naší studii se zabýváme vlivem erytromycinu na proteomový profil populace buněk *Escherichia coli* resistantních k tomuto antibiotiku při dlouhodobé kultivaci v turbidostatu. V tomto systému, podobnému přirozenému životnímu prostředí enterobakterií, jsme sledovali základní fyziologické charakteristiky kultury rostoucí v přítomnosti nebo nepřítomnosti antibiotika a zároveň jsme porovnávali proteomy získané z obou kultur v různých časových fázích kultivace. Vzorky kultur jsme pulzně značili ³⁵S metioninem a porovnávali hladiny exprese proteinů lišících se mezi oběma kultivacemi v jednotlivých časech. Z výsledků vyplývá, že kultivace v nepřítomnosti antibiotika vede ke kvantitativním změnám v proteomu bakterie. Celkově byly zaznamenány změny u 43 proteinů, jejichž syntéza se mění více než 2x a to směrem nahoru či dolů. Při srovnání změn v populaci *E. coli* rostoucí s antibiotikem či bez něj jsme zjistili opět kvantitativní změny u 46 proteinů, nicméně se ukázalo, že došlo i ke změnám kvalitativním a to u 2 proteinů, jejichž syntéza byla při kultivaci s erytromycinem zcela zastavena. Při kultivaci s erytromycinem došlo k potlačení syntézy většiny sledovaných proteinů, v 77 hodině se však tento trend obrátil a naopak došlo ke zvýšení syntézy těchto bílkovin. Tento stav nebyl trvalý a ve 103 hodině růstu se kultura opět navrátila do původního stavu.

Rozlišení a charakterizace půdních aktinomycetů při vyhledávání producentů antibiotik manumycinového typu

Petrásek J. (1), Chroňáková A. (1,2), Beníšková P. (1), Hudecová I. (3), Křišťůfek V. (1)

(1) *Biologické centrum AV ČR, v. v. i. - Ústav půdní biologie, Na sádkách 7, 370 05, České Budějovice, Česká republika;* (2) *Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, Branišovská 31, 370 05, České Budějovice, Česká republika;* (3) *Polnohospodářská univerzita, Fakulta biotechnologie a potravinářstva, Tr. A. Hlinku 2, 949 76, Nitra, Slovenská republika*

Aktinomycety představují významné producenty biologicky aktivních látek, mezi které patří také antibiotika manumycinového typu. Díky schopnosti zasahovat do imunitních reakcí a mechanismu apoptózy, mohou tyto látky najít široké uplatnění v biotechnologiích a medicíně. Cílem práce bylo pomocí molekulárně biologických a mikrobiologických metod co nejpřesněji rozlišit a charakterizovat izoláty aktinomycetů, které pocházejí z pracovní sbírky aktinomycetů ÚPB izolovaných z různých ekosystémů (viz Křišťůfek et al., tento sborník). Biomasa kmenů s odlišnými morfologickými znaky (barva kolonie, tvorba vzdušného mycelia a extracelulárních pigmentů) byla napěstována v submerzní kultuře a použita pro izolaci genomické DNA a vytvoření glycerolových konzerv (-76°C). Plotnovou metodou byla zjištěna antibiotická aktivita proti *Bacillus subtilis*. Pro vzájemné porovnání morfologicky odlišných kmenů byla použita metoda box-PCR a podobnost získaných profilů byla vyhodnocena programem Quantity One (BioRad, USA). Porovnání morfologických znaků a box-PCR profilů umožnila ze sbírky vyloučit část velmi podobných kmenů. U kmenů ve sbírce je zkoumána přítomnost genu pro syntézu antibiotik manumycinového typu. Fylogenetická charakterizace kmenů s pozitivním signálem bude provedena pomocí RFLP analýzy 16SrDNA – ITS a sekvenováním části úseku 16SrRNA genu. Budeme sledovat z jakých ekosystémů je vhodné aktinomycety s požadovanými vlastnostmi izolovat a zda jsou si tyto kmeny fylogeneticky příbuzné.

Testování účinnosti par peroxidu vodíku na vybrané druhy bakterií

Prodělalová J., Reichelová M., Dvořáková H.

*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Sběrka zoopatogenních mikroorganismů,
Hudcova 70, 621 00 Brno, Česká republika*

Při práci s nebezpečnými patogeny v mikrobiologické laboratoři s úrovní technického zabezpečení 3 (BSL 3) může dojít ke kontaminaci prostor a povrchů těmito mikroorganismy. Proto musí být laboratoř vybavena vhodným systémem pro dekontaminaci prostor. Dekontaminace prostoru laboratoře včetně vybavení a přístrojů se provádí pomocí plyných dezinfekčních prostředků. Mezi plyny nejčastěji používané k dezinfekci patří formaldehyd. Použití formaldehydu je limitováno zejména jeho vysokou toxicitou a karcinogenními účinky. Bezpečnější alternativou je použití par peroxidu vodíku. V naší laboratoři jsme použili programovatelný generátor par peroxidu vodíku (Sterinis, Gloster Sante Europe) a testovali jeho účinnost na 36 bakteriálních kmenech. Z toho 6 kmenů je označeno jako vysoce rizikové nebo rizikové biologické agens dle vyhlášky č. 474/2002 Sb., dva kmeny jsou zařazeny jako biologičtí činitelé skupiny 3 dle nařízení vlády 178/2001 Sb. Při testování účinnosti par peroxidu vodíku došlo k úplné eliminaci životaschopných bakteriálních buněk u všech testovaných bakteriálních kmenů s výjimkou *Corynebacterium pseudotuberculosis* CAPM 6410. V tomto případě nedošlo k úplné eliminaci životaschopných bakteriálních buněk, ale pouze ke snížení koncentrace téměř o 5 řádů. Závěrem lze říci, že páry peroxidu vodíku mají dobrý baktericidní účinek. Metoda je vhodná pro dekontaminaci prostor mikrobiologické laboratoře BSL 3. Práce byla podporována SÚJB (smlouva č. 21/06).

Testování účinnosti dezinfekčních prostředků na bakterie *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* a *Yersinia pseudotuberculosis*

Reichelová M., Dvořáková H., Prodělalová J.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Sběrka zoopatogenních mikroorganismů, Hudecova 70, 621 00 Brno, Česká republika

Účinnost dezinfekčního prostředku je závislá na celé řadě faktorů, jako je složení, koncentrace a doba působení přípravku, teplota a přítomnost organického materiálu, případně dalších látek, které mohou aktivitu antimikrobiální látky snižovat. Dalším významným faktorem je rezistence infekčního agens k používaným prostředkům. Cílem práce bylo testování účinnosti vybraných dezinfekčních prostředků na vybraných bakteriích rizikové skupiny 2 a 3 uložených ve Sběrce zoopatogenních mikroorganismů (*Burkholderia pseudomallei* CAPM 3462, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* CAPM 5600 a *Yersinia pseudotuberculosis* CAPM 5666). Základní baktericidní aktivita dezinfekčního prostředku byla stanovena suspenzní metodou dle ČSN EN 1040 a ČSN EN 1656. Organické znečištění jsme simulovali přidáním interferující látky (1% kvasniční extrakt a 1% fetální bovinní sérum). Pozitivní výsledky (faktor redukce viability dosáhl hodnoty 10⁵ a více) byly získány u dezinfekčních prostředků 10% Savo Original, 2% Chloramin BM, 2% Incidin plus a 2% Mikasept KAS testovaných na výše uvedených bakteriích. To znamená, že tyto přípravky v použité koncentraci vyhovují požadavkům normy (ČSN EN 1040 a ČSN EN 1656). Dezinfekční prostředek 2% Sekusept forte a 2% Lysoformin 3000 se nepodařilo zneutralizovat a proto nemohla být stanovena jejich baktericidní aktivita. Pro zjištění aktivity by bylo nutné použít jinou metodu, např. membránovou filtraci. Práce byla podporována SÚJB (smlouva č. 21/06).

Searching for subunits of N-demethylincomycin synthetase and its homologue in celesticetin biosynthesis

Ulanová D., Koběřská M., Kopecký J., Jelínková M., Kadlčík S., Olšovská J., Janata J.

Institute of Microbiology, Academy of Science of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic, e-mail: ulanova@biomed.cas.cz

Lincosamides are antibiotics with significant antibacterial effects. Our research is focused on elucidation of function of N-demethylincomycin synthetase subunits, which condense two lincomycin precursors (propyl-L-proline (PPL) and methylthiolincosamide (MTL)) and their analogues in the celesticetin biosynthesis. Amino acid-activating function of LmbC and CcbC subunits was proved recently. Also both clusters contain DNA sequence coding for a putative acyl carrier protein (ACP) important for condensation reaction, but as a part of a gene unrelated to the synthetase activity. The putative ACP coding sequence is located in related clusters as a part of the lmbN gene (in the lincomycin cluster), while in celesticetin cluster as a part of the ccbZ gene, which neighbours the ccbN gene – the homolog of lmbN. In order to explain the function of ACP in lincosamide biosynthesis, disruption of the lmbN gene and its part coding for the putative ACP or a part coding for the MTL biosynthetic protein with the PCR targeting system was done. Production of lincomycin in disruptant *Streptomyces lincolnensis* strains was measured by bioassay and ultra-performance liquid chromatography. Disruption of the whole lmbN gene, as well as its both parts separately, resulted in abolishment of lincomycin production. Production of lincomycin by disruptant of *S.lincolnensis* with remaining part of the lmbN gene coding for putative ACP was restored after adding MTL into a fermentation broth.

Produkce biofilmu - faktor virulence u kmenů izolovaných z infikovaných cévních katetrů

Čermák P. (1), Cmielová J. (2), Čermáková S. (3)

(1) Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a Univerzita Karlova v Praze 1.

Lékařská fakulta; (2) Univerzita Pardubice, fakulta chemickotechnologická; (3)

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Úvod: Infekce cévních katetrů představují závažné komplikace ústí v katastrofě sepse ohrožující život pacienta. Významným faktorem virulence bakterií infikujících cévní katetr je tvorba biofilmu. Cílem práce bylo ověřit kultivační metodu průkazu tvorby biofilmu a výskyt biofilm produkujících kmenů infikujících cévní katetry. Metody: Množství bakterií přítomných na špičce cévního katetru zasahující do krevního řečiště bylo stanoveno kvantitativní kultivační metodou. Produkce biofilmu byla stanovena kultivační metodou a barvením dle Christensena. Testované kmeny byly kultivovány 24 hodin v tryptózosojovém (TS) a v Mueller – Hintonově (MH) bujónu v mikrodestičce. Výsledky: Na produkci biofilmu bylo testováno celkem 114 kmenů z infikovaných katetrů od pacientů hospitalizovaných ve FN Hradec Králové. Nejčastěji byly izolovány koaguláza negativní stafylokoky v 69 (60,5%) a *Staphylococcus aureus* ve 13 (11,4%) případech. Enterobakterie byly izolovány ve 12 (10,5%) a nefermentující tyčky v 8 (7%) případech. V TS bujónu byla prokázána produkce biofilmu u 47 (41,2%) kmenů, v MH bujónu pouze u 19 (16,7%) kmenů. Celkem bylo prokázáno 54 (47,4%) kmenů produkujících biofilm. Většinu producentů biofilmu (87%) tvořily grampozitivní koky, zejména *S. epidermidis*, u kterého byla tato vlastnost prokázána u 82,6% zachycených kmenů. Biofilm produkovalo rovněž 66,7% enterokoků a pouze 15,4% kmenů *S. aureus*. Závěr: Christensenova metoda s použitím TS bujónu je vhodná pro rutinní praxi.

Infekce kloubní náhrady jako důsledek tvorby biofilmu na povrchu implantátu

Gallo J., Večeřová R., Čechová I., Lovečková Y., Koukalová D., Kolář M., Sauer P.

Ortopedická klinika LF UP a FN Olomouc Ústav mikrobiologie LF UP a FN Olomouc Hněvotínská 3 Olomouc 77515

Kloubní náhrady jsou považovány za vynikající řešení těžkých artrotických stavů, jejich obávanou komplikací je však periprotetická infekce (PPI). Ta je nejčastěji způsobena stafylokoky, izolovány však bývají i streptokoky, enterokoky a gram-negativní bakterie. PPI je výsledkem složité interakce, do níž zasahuje významně i samotný implantát, kolem něhož vzniká zóna oslabené imunitní aktivity. Navíc představuje protéza atraktivní povrch pro bakterie, které na ní vytváří vlastní tkáň (biofilm) odolnou vůči imunitnímu systému i antibiotikům. Z hlediska diagnostiky je problémem odlišení aseptických selhání od pozdní infekce s nevýrazným klinickým obrazem. Zlatým standardem terapie PPI zůstává vyjmutí infikovaného implantátu a radikální vyčištění (debridement) postižené oblasti. Porozumění zákonitostem budování bakteriální tkáň na povrchu implantátů dovoluje uplatňovat efektivnější preventivní i léčebné strategie. V prevenci je důležité především minimalizovat šanci na efektivní průnik bakterií do operační rány a k implantátu. Jinou možností je vývoj implantátů schopných odolávat adhezi bakterií či dokonce bránit tvorbě biofilmu. Nepochybný význam má profylaktické podávání antibiotik. Na poli terapie přinesl soustředěný výzkum biofilmu nové léčebné možnosti v podobě antibiotik schopných působit skrze biofilm (např. rifampicin, linezolid, daptomycin) nebo látek narušujících quorum-sensing signalizaci v biofilmu. Podpořeno vědecko-výzkumným záměrem MSM6198-959223.

Tvorba biofilmu u nozokomiálních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných z jednotek intenzivní péče FN u sv. Anny

Holá V., Macháčová M., Růžička F., Tejkalová R.

Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty MU a FN u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 65691 Brno, CZ

Schopnost tvorby biofilmu napomáhá mikrobům v kolonizaci umělých i nativních povrchů v těle pacienta. Zvláště významnou roli může tato schopnost hrát v kolonizaci oslabených pacientů, např. na jednotkách intenzivní péče. Zaměřili jsme se na testování biofilmpozitivity *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných od pacientů jednotek intenzivní péče FN u sv. Anny. Cílem naší práce bylo zjistit schopnost tvorby biofilmu a fenotypovou variabilitu u kmenů *P. aeruginosa* izolovaných od těchto pacientů a také porovnat schopnost tvorby biofilmu u skupiny kmenů izolovaných od pacientů opakovaně a skupiny kmenů izolovaných od daného pacienta jen jednou. U 180 kmenů *P. aeruginosa* jsme vyšetřili schopnost tvorby biofilmu, hodnoty MIC a sérotyp. U všech kmenů byla rovněž sbírána data o délce hospitalizace pacienta, materiálu izolace, opakovaném výskytu, oddělení apod. Téměř 70 % kmenů ze skupiny opakovaných izolátů bylo schopno tvořit biofilm, více než 45 % kmenů bylo silnými producenty biofilmu. Ze skupiny jednorázově izolovaných kmenů jsme schopnost tvorby biofilmu prokázali u 45 % kmenů, u většiny z nich slabou (29 %). Ve biofilmpozitivě jsme prokázali rozdíly i mezi izoláty z jednotlivých oddělení, stejně jako v dalších fenotypových projevech. Přestože gramnegativní nefermentující bakterie jsou obecně považovány za málo patogenní, přítomnost faktorů virulence, jako je schopnost tvorby biofilmu, zvyšuje jejich klinický význam, zvláště u oslabených pacientů. Podpořeno grantem GAAV AX00310701.

Vplyv vybraných antifungálnych látok na hydrofóbnosť povrchu buniek a tvorbu biofilmu in vitro u *Candida glabrata*

Kucharčíková S. (1), Chorvát D. jr. (2), Lisalová M. (3) and Bujdáková H. (1)

(1) Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Bratislava, Slovensko; (2) Medzinárodné laserové centrum, Bratislava, Slovensko; (3) HPL s. r. o, Bratislava, Slovensko

Do štúdie bolo zahrnutých 50 klinických izolátov *C. glabrata* a *C. glabrata* ATCC 2001. MIC pre flukonazol (FLU), itrakonazol (ITR), vorikonazol (VOR), amfotericín B (AMB), 5-fluorocytosín (FLC), mikafungín (MIK) a kaspofungín (CAS) bola stanovená podľa NCCLS M27-A2. Tvorba biofilmu bola sledovaná na základe redukcie XTT. Percento hydrofóbnych buniek bolo stanovené vytrepáním suspenzie do n-oktánu. Expresia génu *CgERG11* bola vyhodnotená reverzno-transkriptázovou PCR. RNA bola izolovaná z *C. glabrata* ATCC 2001 po 1.5 h, 6 h, 24 h a 48 h tvorbe biofilmu. Na sledovanie štruktúry biofilmu bol použitý konfokálny skenovací laserový mikroskop (CSLM). Z výsledkov vyplynulo, že 30% klinických izolátov *C. glabrata* bolo rezistentných voči FLU, 16% voči VOR a AMB. Všetky izoláty boli rezistentné voči ITR. Schopnosť tvorby biofilmu bola slabá u 10 izolátov ($OD_{490} < 0.1$), stredná u 18 klinických izolátov ($OD_{490} = 0.1-0.3$) a relatívne vysoká u 22 izolátov ($OD_{490} > 0.3$). V prípade CSH, 32 izolátov tvorilo menej ako 10% hydrofóbnych buniek, 12 izolátov vykazovalo 10% - 30% hydrofóbnych buniek a 7 izolátov tvorilo viac ako 30% hydrofóbnych buniek. FLU, ITR, VOR, AMB, FLC a MIK signifikatne redukovali CSH ($p < 0.005$) s výnimkou CAS ($p > 0.005$). Subinhibičné koncentrácie FLU a VOR redukovali tvorbu biofilmu ($p < 0.005$) s výnimkou ITR ($p > 0.005$). Expresia *CgERG11* u *C. glabrata* ATCC 2001 po 48 h tvorbe biofilmu bola znížená bez ohľadu na prítomnosť/absenciu FLU.

Morfologické typy terénních kmenů *Salmonella enterica* sérovar *Typhimurium* a jejich vztah ke tvorbě biofilmu

Malcová M., Rychlík I.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství Hudcova 70 Brno 621 00

Životní cyklus *Salmonella enterica* sérovar *Typhimurium* (STM), způsobující nespecifická střevní onemocnění, je přizpůsoben střídání prostředí uvnitř a vně hostitele. Vně hostitele je STM vystavena sníženému osmotickému tlaku a nízkému obsahu živin. Tyto podmínky překonává růstem v podobě specializovaných kolonií, které byly popsány jako morfologické typy SAW (Smooth and White), BDAR (Brown Dry and Rough) a RDAR (Red Dry and Rough). Na jejich tvorbě se podílejí vláskové fimbrie, celulóza a kapsulární polysacharidy. Tyto struktury definují schopnost tvorby biofilmu, která je u STM rozšířená, a byly popsány na příkladech delečních mutantů STM. Význam morfologických typů u kmenů z terénu není jasný. Proto jsme otestovali na tvorbu morfologického typu a produkci biofilmu 93 terénních kmenů STM o známém fágovém typu a profilu pulsní gelové elektroforézy. Pouze 18% kmenů pocházejících zejména z holubů nebylo schopno tvorby biofilmu. Zbylé kmeny, které zahrnovaly morfologické typy BDAR a RDAR, vytvářely různě strukturované biofilmy. Soubor kmenů obsahoval 5 kmenů, které neprodukovaly celulózu ani vláskové fimbrie, ale vyznačovaly se zvýšenou produkcí kapsulárního polysacharidu, a to v samotném biofilmu i jeho celkovou produkcí v buněčné kultuře. Přítomnost těchto struktur potvrdila elektronová mikroskopie. STM je tak schopna tvořit biofilm nejen prostřednictvím vláskových fimbrií a celulózy, ale také pomocí hydratovaných polysacharidových složek typu bakteriálního pouzdra.

Mikrobiální biofilmy v přírodním prostředí – současný stav poznání

Rulík M.

Katedra ekologie PŘF UP, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Baktérie jeví zřetelnou tendenci přisedat k nejrůznějším povrchům a vytvářet zde biofilm. Existence v biofilmu je pro bakterie z mnoha důvodů výhodnější a ve většině prostředí je také základním způsobem jejich přirozeného výskytu. Biofilmové nároty se vyskytují prakticky všude, kde jsou přítomné mikroorganismy. Z tohoto důvodu je studiu biofilmů věnována pozornost v nejrůznějším odvětvích lidské činnosti (biokoroze, vodárenství, čištění odpadních vod aj.). Biofilmy zde působí mnohé problémy, neboť znečišťují povrchy, na nichž se tvoří, případně je poškozují korozí, snižují estetickou kvalitu upravené vody a mohou být rovněž zdrojem některých patogenních infekcí. Studium biofilmových společenstev těží z poznatků, spolupráce a společného úsilí výzkumníků z velmi rozdílných disciplín, od environmentálních biologů, přes chemiky až po inženýry a matematiky zabývající se modelováním biofilmů. V současné době existuje o biofilmech ohromné množství znalostí a není vůbec jednoduché se v celé problematice orientovat. Ve svém příspěvku se chci proto pokusit o shrnutí nejdůležitějších poznatků, získaných dosavadním výzkumem mikrobiálních biofilmů v přírodním prostředí.

Možnosti detekce biofilmopozitivních mikrobů na základě jejich povrchových vlastností

Růžička F. (1), Holá V. (1), Horká M. (2), Tejkalová R. (1), Votava M. (1)

(1) *Mikrobiologický ústav LF a FN u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91, Brno;*

(2) *Ústav analytické chemie AVČR, Veveří 97,602 00, Brno*

Tvorba biofilmu je pro celou řadu lékařsky významných mikroorganismů významným faktorem virulence a biofilmopozitivní kmeny jsou považovány za klinicky významnější. O tom, zda izolovaný mikrob biofilm skutečně tvoří, se lze přesvědčit pomocí fenotypových metod, např. často používanou Christensenovou zkumavkovou metodou či její modifikací. Tyto metody jsou však časově náročné a jejich výsledky mohou být snadno ovlivněny kultivačními podmínkami. Další komplikací je možnost vzniku subjektivní chyby při hodnocení výsledků. Vzrůstající incidence závažných infekcí spojených s tvorbou biofilmu vede k potřebě rychlé a spolehlivé detekční metody tohoto faktoru virulence. Jednou ze slibných cest pro odlišení biofilmopozitivních a biofilmnegativních mikroorganismů je využití rozdílů v jejich povrchových vlastnostech. V této práci jsme se zaměřili na stanovení jejich izoelektrického bodu (pI) pomocí jedné z elektromigračních technik, kapilární izoelektrické fokusace (CIEF). Pomocí CIEF, v gradientu pH 2-3, se nám podařilo rozlišit biofilmopozitivní kmeny *S. epidermidis* (pI = 2,3) od biofilmnegativních (pI = 2,6). Výsledky CIEF dobře korelovaly s výsledky Christensenovy metody i s přítomností genů ica operonu. Také u kandid (C. parapsilosis a C. tropicalis) se lišil pI biofilmnegativních a biofilmopozitivních kmenů a výsledky CIEF korelovaly s výsledky dalších metod fenotypového průkazu schopnosti tvořit biofilm. Podpořeno GA AV AX00310701

Modulácia biofilmu a stresu u *Pseudomonas aeruginosa* a *Vibrio cholerae* non- 01 v závislosti na kultivačných médiách.

Hošťacká A., Čižnár I.

Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 83303 Bratislava, Slovensko

Testovali sme tvorbu biofilmu a odpoveď na oxidačný stres u dvoch odlišných bakteriálnych druhov *P. aeruginosa* a *V. cholerae* non-01 v šiestich kultivačných médiách (komplexné - 5, minerálne -1). Kvantita biofilmu produkovaná baktériami oboch druhov bola najväčšia po kultivácii v tryptónovo-sójovom médiu (TSB), resp v TSB obohatenom o 8% glukózy (TSB+GL), najnižšia v minerálnom médiu (MM). Odpoveď na oxidačný stres vyvolaná peroxidom vodíka bola u *P. aeruginosa* ovplyvnená zložením kultivačného média na rozdiel od vibrií. Najvyššiu rezistenciu u *P. aeruginosa* sme zistili po kultivácii v peptónovej vode, najcitlivejšie boli bunky po kultivácii v TSB+GL a v MM. U vibrií kvantita biofilmu závislá na zložení kultivačného média nebola spojená s výraznými zmenami v bakteriálnej odpovedi na oxidačný stres. U *P. aeruginosa* sme zistili čiastočnú závislosť. Vyššia citlivosť na oxidačný stres bola spojená s najvyššou ($A_{550} = 0,390, 0,370$) ako aj s najnižšou ($A_{550} = 0,086$) kapacitou tvorby biofilmu. Vyššia rezistencia sa spájala s tvorbou biofilmu v rozsahu $A_{550} = 0,230-0,280$. Táto práca bola podporovaná Mzd SR v rámci projektu Analýza tvorby biofilmu u nozokomiálnych bakteriálnych kmeňov ako základ pre prevenciu infekcií v zdravotníckych zariadeniach č. 2005/24-SZU-02 a APVV v rámci projektu Znovu hrozíce patogény-vibriá. Štúdium virulencie a možnej aktívnej imunomodulačnej ochrany APVV 0032-06.

Vplyv rôznych kultivačných podmienok na tvorbu biofilmu u *C. albicans* in vitro

Kolečka A. (1), Chorvát D. (2), Gašperik J. (3), Volleková A. (4), Bujdáková H. (1)

(1) *Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská Republika;* (2) *International laser Center, Ilkovicova 3, 812 19 Bratislava, Slovenská Republika;* (3) *Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenska republika;* (4) *HPL spol. s r.o., Istrijská 20, 841 07 Bratislava, Slovenská Republika*

Predmetom príspevku bolo štúdium vplyvu kultivačných podmienok na tvorbu biofilmu u kvasinky *C. albicans* bez prítomnosti a v prítomnosti antifungálnej látky flukonazol. Študovala sa aj expresia génu ERG11 počas tvorby biofilmu. Pracovalo sa so štandardným kmeňom *C. albicans* SC5314 a klinickým izolátom *C. albicans* 1173. Na testovanie boli použité dve médiá, a to YNB médium s aminokyselínami a RPMI médium s pH=5,6 a pH=7,0 s obsahom glukózy buď 0,9 alebo 2%. Formovanie in vitro biofilmu bolo detegované spektrofotometricky pri OD490 pomocou redukcie XTT tetrazoliovej soli na formazan. Výsledky boli korelované so sušinou biofilmovej kultúry. Tvorba biofilmu v RPMI médiu bola pri všetkých podmienkach pomerne vysoká, takže bolo problematické experiment spektrofotometricky vyhodnotiť. Z tohto dôvodu je optimálne použiť YNB médium. Zároveň sa potvrdilo, že koncentrácia glukózy nie je pre tvorbu biofilmu kľúčová, pričom hodnota pH = 7,0 výrazne zvyšuje jeho tvorbu. Flukonazol redukoval tvorbu biofilmu pri všetkých kultivačných podmienkach, pričom výrazne ovplyvnil aj morfológickú formu *C. albicans*, čo bolo potvrdené pozorovaním v konfokálnom mikroskope. Okrem inhibície tranzície z kvasinkovej formy na mycéliovú, bola pozorovaná aj redukcia v hrúbke biofilmu. Potvrdené boli aj zmeny v expresii ERG11 génu v závislosti od testovaných podmienok metódou RT-PCR, pričom RNA bola izolovaná z rôznych fáz biofilmovej kultúry ako aj z planktonických buniek.

Adhesion of bacterial strains *Enterococcus faecium* with probiotic effect - isolates from rabbits on IPEC-J2 cells and TER measurements

Simonová M. (1), Marciňáková M. (1), Klingberg T. D. (2), Lauková A. (1), Budde B. B. (2)

(1) *Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Slovakia;* (2) *Department of Food Science, Food Microbiology, The Royal Veterinary and Agriculture University, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark*

Lactic acid bacteria are intensively investigated as a dietary adjuncts for gastrointestinal disorders in animals and humans. To exert beneficial effect adequate numbers of viable cells of probiotics should reach the intestinal tract. One of the main criteria for selecting probiotic strains is their ability to adhere to intestinal surfaces. Adhesion capacity of strains has often been examined using intestinal cell lines e.g. IPEC-J2 as in vitro models for intestinal epithelium. Recent research has focused on the ability of probiotics to strengthen the epithelial barrier. The integrity of epithelial monolayers can be evaluated by measuring the electrical physical resistance to determine the transepithelial electrical resistance (TER), which reflects the ion permeability of the monolayer; it is sensitive method for screening possible membrane perturbants. The aim of this study was to determine the differences in the adhesion capacity of potential probiotic *Enterococcus faecium* strains isolated from faeces of rabbits (own isolates) to IPEC-J2 cells and changes in the TER. The adhesion capacity to IPEC-J2 cells varied for the different strains; *E. faecium* CCM7420 (EF2019) possessed the highest adhesion capacity ($3.8 \pm 0.4\%$). All tested strains CCM7420, EF529 and EF1839 increased the TER of polarized Caco-2 monolayers and also prevent the decrease in TER induced by *Salmonella enterica* s. *Enteritidis* PT4. This study was financially supported by the project VEGA 2/5139/27.

Adhesion of different bacteriocinogenic and probiotic bacteria on IPEC-J2 cells

Simonová M. (1), Marciňáková M. (1), Klingberg T. D. (2), Stropfiová V. (1), Lauková A. (1), Budde B. B. (2)

(1) *Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Slovakia;* (2) *Department of Food Science, Food Microbiology, The Royal Veterinary and Agriculture University, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark*

Lactobacilli and enterococci are frequently used as animal feed supplements or probiotic preparations for animals. Acid and bile tolerance can easily be monitored and are considered important properties of probiotic lactic acid bacteria. Furthermore, adhesion to the intestinal epithelial cells is considered important as a first step for probiotic activity eg. immune modulation, pathogen exclusion, enhanced healing of damaged mucosa and prolonged transient colonization. Some researchers noticed that the addition of small amounts of calcium enhanced bacterial adhesion to cell - surfaces in a number of different assays. The aim of this study was to examine the adhesion of bacteriocinogenic and potential probiotic strains isolated from faeces of rabbits and chickens, from silage and canine feed to IPEC-J2 cells and to investigate the effect of low pH (3.0), bile (0.3% oxgall) and calcium on adhesion capacity. The adhesion capacity to IPEC-J2 cells varied for the different strains. The strains exhibited relatively low adhesive capacities (2 – 4 %) compared to the highly adhesive control strain of *Lactobacillus reuteri* 12002 (15.5 ± 1.4 %). The adhesion capacity was variable following exposure to oxgall and/or low pH. Calcium increased the adhesion capacity - the adhesion capacity of the strains EF1839, EF529 (rabbits isolates) and EE3 (canine feed isolate) increased from 2-3 % up to 50-55 % upon calcium addition. This work was financially supported by the project VEGA 2/5139/27.

The development of the fluffy morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is co-ordinated

Vopálenská I., Janderová B., Palková Z.

Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

A laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278 growing on glycerol agar medium forms markedly structured colony exhibiting a fluffy pattern similar to colony morphology of many natural yeast strains (Kuthan et al., 2003; Palkova, 2004). We found that development of the Σ 1278 colony is not accidental but it proceeds in a regulated manner. Regulation of the development appears to be connected with ammonia signalling. The first pulse of ammonia production during first alkali phase of colony development (Palkova et al, 1997) induces switch of the Σ 1278 haploid cells from yeast to pseudohyphal form followed by co-ordinated formation of aerial "guts" on the colony. This transition could be induced also by an artificial source of ammonia. The second pulse of ammonia production during second alkali phase in older colonies precedes formation of rapidly growing smooth sectors composed of yeast cell forms. Our results show that individual periods of colony development separated by ammonia pulses represent different strategies enabling effective yeast growth under changing life conditions. Fluffy morphology represents a strategy allowing cell population in a colony to expand to the high and to improve contact with the oxygen. On the contrary, the cells in smooth sectors are able to successfully expand out of the colony to broader surroundings. The work is supported by MSM0021620858 and by grants, LC06063, GACR204/05/0294 and IAA500200506.

Vliv extracelulárních aminokyselin na amoniakovou signalizaci kolonií *Saccharomyces cerevisiae*

Zikánová B., Palková Z.

Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika.

Kvasinkové kolonie jsou organizované struktury schopné vzájemné komunikace. Roli signální molekuly při jejich vývoji hraje amoniak, který je produkován během růstu kvasinkových kolonií na pevných agarových médiích v pulzech [1]. Amoniak vzniká pravděpodobně deaminací aminokyselin, které jsou pro jeho produkci nezbytné. Naopak, produkce amoniaku je nezávislá na přítomnosti extracelulárních amonných iontů [2]. Již dříve jsme zjistili, že u kolonií kvasinek *Candida mogii* se liší produkce amoniaku v závislosti na tom, jaká konkrétní aminokyselina je v růstovém médiu přítomna [2]. V této práci jsme se zaměřili na sledování vlivu přítomnosti jednotlivých aminokyselin v agarovém médiu na produkci amoniaku a schopnost alkalizace média koloniemi *Saccharomyces cerevisiae*. Narozdíl od kvasinek *C.mogii*, máme již k dispozici údaje o změnách exprese genů kódujících proteiny metabolismu aminokyselin v průběhu vývoje kolonií *S.cerevisiae* [3]. Získané výsledky proto mohou přispět k zjištění metabolických drah důležitých pro produkci amoniaku. Zjistili jsme, že transport/utilizace aminokyselin a produkce amoniaku koloniemi *S.cerevisiae* se výrazně liší podle přítomnosti jednotlivých aminokyselin. Práce byla podporována granty GAČR 204/02/0650, MSM00 21620-858. [1] Palková et al, (1997). [2] Zikánová et al, (2002). [3] Palková.et al,(2002).

A bioinformatical approach to analysis of viral and cellular internal ribosome entry sites (IRESs)

Mokrejš M., Vopálenský V., Mašek T., Pospíšek M.

Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta, katedra genetiky a mikrobiologie

The Internal Ribosome Entry Site (IRES) is a part of the mRNA sequence which is able to attract the eukaryotic ribosomal initiation complex and to directly promote the initiation of protein synthesis independently of the presence of 5'-terminal 7mG cap. Although the IRES segments and thus the cap-independent translation initiation were first described in viruses, extensive evidence has appeared in the past few years that a similar principle of the translation initiation is utilized also by some cellular mRNAs. Demonstration of IRES activity of a particular RNA region is not a simple task and a proper design of the experiment and a careful selection of the controls are very important. A number of false positives described in the literature as well as difficulties in designing appropriate controls have become the major stimuli for creating IRESite - the publicly available manually annotated database of experimental results. We present the current status of the IRESite database, the complete list of ever claimed and experimentally characterized viral and cellular IRESs and results from comparative analyses of IRESs (GC content, length and AUG codon occurrence). We show distinct features of viral RNAs versus the features of cellular messages bearing (or claimed to contain) IRES. E-mail: mmokrejs@iresite.org

PDB, Protein Data Bank, portal for structural biology

Schneider B.

Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Fleming Sq. 2, CZ-16610 Prague, Czech Republic

as developed many tools for the deposition and validation of structures. The archive is available in a form of the relations database with extensive tools to query and report; the web also provides many resources for understanding the structure of biological macromolecules and access to files of all deposited structures. The whole PDB archive has recently been remediated and a new set of corrected files has been created. The most significant changes include extensive corrections in the ligand dictionary where redundant ligand definitions have been removed, ligand naming corrected, including stereochemistry at all chiral centers, atom naming was harmonized with the IUPAC nomenclature as much as possible. Of importance are also updates of many sequence and publication references; all existing sequence references point uniformly to the UniProt (UNP) database. Data distribution. Coordinate files, database reports, software programs, and other resources are freely available from the web pages of both databases. Acknowledgements. The PDB project is funded by the National Science Foundation, the Department of Energy, the National Institute of General Medical Sciences, and the National Library of Medicine. BS kindly acknowledges support by a grant from the Ministry of Education of the Czech Republic No. LC512 for the Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems.

Genom bakterie *Rhodobacter capsulatus*

Strnad H. (1), Vlček C. (1), Pačes J. (1), Ulbrich P. (2), Zíka R. (1), Lapidus A. (3), Maltsev N. (3), Kogan Y. (3), Fonstein M. (3), Pačes V. (1) a Haselkorn R. (3)

(1) *Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Vídenská 1083, Praha 4, 142 20;* (2) *Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, Praha 6, 16628;* (3) *University of Chicago, Molecular Genetics and Cell Biology, Chicago, IL 60637 USA*

Rhodobacter capsulatus patří do skupiny purpurových nesírných bakterií, které jsou schopné fotosyntetického růstu a fixace vzdušného dusíku. Sekvenační projekt byl zahájen v roce 1995 přípravou kompletní kosmidové knihovny a přesné restriční mapy genomu. Ke stanovení celkové nukleotidové sekvence byla použita strategie sekvenování kosmidových klonů, která byla v závěru projektu kombinována s metodami cíleného klonování. Výsledný genom s vysokým obsahem GC (66.7%) se skládá z chromozómu o velikosti 3.7 Mb a plasmidu o velikosti 133 kb. Analýzou sekvence bylo identifikováno 3664 ORFů. Jednotlivé ORFy byly analyzovány a v přibližně 70% případů jim byla přidělena předpokládaná biologická funkce a genová ontologie (GO). Jednotlivé ORFy byly klastrovány do ortologních skupin (COG). Rekonstrukce metabolických drah byla provedena v programu "Pathway Tools". V genomu byl také identifikován neobvyklý počet kryptických fágů.

Genomová struktura spirochet rodu *Treponema*

Šmajš D., Matějková P., Strouhal M., Čejková D., Zobaňková M., Šmarda J.

Biologický ústav LF MU, Kamenice 5, Budova A6, Brno, 625 00, CZ

Byly získány genomové sekvence sedmi zástupců rodu *Treponema*, t.j. 3 kmenů *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols, SS14, Dal-1), 3 kmenů *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* (CDC2, Gauthier, Samoa D) a *Treponema paraluis-cuniculi* kmene Cuniculi A. Získané genomové sekvence byly porovnány a nalezené rozdíly byly korelovány s mírou patogenity a invazivity jednotlivých kmenů, poddruhů a druhů. Sekvenční rozdíly mezi genomy stejného poddruhu sloužily pro definování rozsahu genetické variability uvnitř poddruhu a k identifikaci genetických rozdílů odpovědných za odlišnou míru patogenity jednotlivých kmenů. Mezipodruhové rozdíly pak určovaly různou míru patogenity mezi poddruhy *pallidum* a *pertenue*. Mezi druhové rozdíly definovaly rozdíly mezi patogenními a nepatogenními spirochetami. Porovnáním genomů jsme identifikovali variabilní úseky genomů, které mohou sloužit pro molekulární identifikaci jednotlivých kmenů, poddruhů a druhů. Výrazná variabilita byla zaznamenána zejména v *tpr* genech a v hypotetických genech v jejich okolí. Ukazuje to na roli *Tpr* proteinů v patogenezi syfilis a yaws. Podporováno granty GAČR č. 310/07/0321 a IGA MZ ČR č. NR/8967-4/2006.

Bartonella henselae implicated in human infectious endocarditis

Melter O.(1), Hulíská D.(1), Bartůněk P.(2)

1. National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic 2. 4th Department of Medicine of the 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Bartonellae are emerging bacterial pathogens causing localized or systemic human infections. *Bartonella henselae* commonly known as the agent of cat scratch disease is also responsible for various infections in humans including serious ones such as endocarditis. Clinical specimens from 9 patients with infectious endocarditis were analyzed by conventional and quantitative real-time PCR, DNA sequencing, electron microscopy and indirect immunofluorescent assay (IFA). DNA of *Bartonella henselae* was detected in the 3 patients, indicating possible implication of the bacterium in the condition, even when would be culture negative because of the fastidious nature of *Bartonella henselae*.

Charakteristika izolátů *Listeria monocytogenes* v ČR

Karpíšková R. (1), Belušíková Z. (2), Jakubcová L. (1), Pospíšilová M. (1)

(1) Centrum hygieny potravinových řetězců Brno, Státní zdravotní ústav Praha; (2) Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Listeria monocytogenes je významným původcem alimentárních onemocnění, vyvolávajících zejména u rizikové části populace závažná a život ohrožující onemocnění. Výskyt tohoto patogena v prostředí i v potravinách však není žádnou vzácností. Listerie se mohou vyskytovat i v prostředí potravinářských výroben, kde osidlují zejména špatně čistitelná místa výrobních technologií. Odtud se mohou v malých množstvích uvolňovat a kontaminovat surovinu nebo přímo výrobky. Na přelomu let 2006 a 2007 proběhla v ČR epidemie listeriózy. Cílem naší studie bylo charakterizovat etiologické agens, které onemocnění vyvolalo a odhalit vehikulum infekce. K tomu byly kromě ultivačních metod použity i typizační metody: serotypizace, rezistence k antimikrobiálním látkám a makrorestrikční analýza bakteriálního genomu (PFGE). Pomocí těchto metod se podařilo odhalit zdroj nákazy. Celkem bylo vyšetřeno 47 humánních izolátů a 180 izolátů z potravin. Epidemický klon byl charakterizován jako *Listeria monocytogenes* serotypu 1/2a, citlivý k antimikrobiálním látkám používaným při terapii listerióz. Tento klon byl označen jako pulzotyp A/1. Shodný klon byl zjištěn u dvou výrobků zrajících sýrů jednoho výrobce z Plzeňska. Práce byla realizována za finanční podpory projektu MŠMT 2B06048 a výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM6215-712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Dog as a sentinel for human *Anaplasma phagocytophilum* infection

Melter O. (1), Uherková L. (1), Hulínská D. (1), Kybicová K. (1), Votýpka J. (1), Kinská H. (2)

(1) National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; (2) Labvet, Clinical Veterinary Laboratory, Prague, Czech Republic

Anaplasma phagocytophilum is an obligate intracellular tick-borne pathogen known to cause granulocytic infections in both animals and humans. Anticoagulated venous blood and serum from febrile, depressed dogs with *Ixodes ricinus* ticks previously attached to the skin were analyzed. The dogs presented with hematological disorders and elevated levels of hepatic enzyme activity. Intracellular inclusions or single cell bacteria were observed in granulocytes. The agent was also detected by light and electron microscopy in cultured HL60 cells. Detection and analysis of DNA fragments specific for *A. phagocytophilum* and detection of specific antibodies supported the diagnosis of anaplasma infection. Thus animals especially pets could be also sentinel for human *A. phagocytophilum* infection.

Výskyt *Brachyspira pilosicoli* u prasat a psů v České republice

Prášek J., Šperling D., Smola J., Čížek A.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno

B. pilosicoli může kolonizovat tlusté střevo různých druhů živočichů i člověka. Klinické infekce byly popsány zejména u člověka, prasat, psů a hrabavé drůbeže. Projevují se u člověka i zvířat nejčastěji kolitidou provázenou hubnutím a průjmem s příležitostnou příměsí krve. U lidí bývá *B. pilosicoli* izolována častěji v zemích s nízkou úrovní hygieny, v rozvinutých zemích pak u mužů homosexuálů, HIV pozitivních a imunosuprimovaných lidí. V současnosti je diskutován zoonotický potenciál tohoto mikroorganismu. Cílem naší práce bylo zjistit prevalenci *B. pilosicoli* na úrovni chovů prasat a u psů chovaných v domácnostech. V období od října 2006 do dubna 2007 bylo celkem vyšetřeno 387 vzorků rektálních výtěrů prasat z 51 farem z celé České republiky. Dále bylo vyšetřeno 23 vzorků výkalů psů, u kterých již předtím byla potvrzena přítomnost spirochét mikroskopicky. Vzorky byly kultivovány na Wilkins-Chalgren agaru s přidavkem antibiotik a inkubovány v anaerobní atmosféře po dobu 4-6 dnů při teplotě 37 °C. Získané kultury byly identifikovány druhově specifickou PCR. *B. pilosicoli* byla potvrzena ve 12 (3,10 %) z 387 vzorků prasat, která pocházela z 8 (15,69 %) pozitivních farem. Ve 2 případech (0,51 %) se jednalo o smíšenou infekci *B. pilosicoli* a *B. hyodysenteriae*. *B. pilosicoli* byla potvrzena u 9 psů (39,13 %). Záchytnost *B. pilosicoli* mohla být snížena použitím antibiotického suplementu izolačního postupu určeného pro původce dysenterie prasat *B. hyodysenteriae*.

Diagnostika a léčba nokardiosy

Scharfen J. (1), Bergerová T. (2), Mellmann A. (3), Urbášková P. (4), Harmsen D. (3), Stárková H. (5)

(1) Národní referenční laboratoř pro patogenní aktinomycety, Oddělení lékařské mikrobiologie a imunologie, Oblastní nemocnice Trutnov, Gorkého 8, 541 01 Trutnov; (2) Ústav klinické mikrobiologie, LH UK PLzeň; (3) University Münster, Deutschland (4) Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav Praha (5) Národní referenční laboratoř pro patogenní aktinomycety, Oddělení lékařské mikrobiologie a imunologie, Oblastní nemocnice Trutnov, Gorkého 8, 541 01 Trutnov

Uvedeny kazuistiky nokardiosy u pacientů vesměs imunosuprimovaných po transplantaci, klinická a mikrobiologická diagnostika onemocnění, identifikace kmenů, vyšetření citlivosti na antibiotika a léčba pacientů.

Sérologický průkaz *Lawsonia intracellularis* u myší odchycených v chovech prasat s výskytem prasečí proliferativní enteropatie.

Bednář V. (1), Nadzonová M. (2), Klimeš J. (2), Literák I. (2), Smola J. (1)

(1) Ústav mikrobiologie a imunologie, FVL, (2) Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, Brno, 61242

Lawsonia intracellularis je původcem prasečí proliferativní enteropatie (PPE) a prase domácí (*Sus scrofa domestica*) se považuje za hlavní hostitelský druh. Ze zvířat žijících volně v přírodě byla bakterie prokázána především u prasete divokého (*Sus scrofa*), jelena lesního (*Cervus elaphus*), vlka obecného (*Canis lupus*) a lišky obecné (*Vulpes vulpes*) (2). V roce 2006 byla *L. intracellularis* poprvé detekována ve střevě myší domácích (*Mus musculus*), odchycených z farem prasat s výskytem PPE, metodou nested PCR. Od května do prosince roku 2006 byla sledována přítomnost *L. intracellularis* u myší ve dvou chovech v České republice s pozitivním výskytem této bakterie. Myši byly loveny do sklapovacích a živolovných pastí kladených líniovou metodou v areálech farem prasat. Ze živě ulovených myší byla získána krev a po usmrcení směsný vzorek střeva (ileum, cécum, colon) k přímé detekci *L. intracellularis*. Séra byla testována na průkaz IgG protilátek proti *L. intracellularis* metodou nepřímé imunofluorescence. Výsledky přímého a nepřímého průkazu *L. intracellularis* u jednotlivých myší byly vzájemně porovnány. Práce byla řešena z MSM 6215712402 (MŠMT ČR) a IGA VFU Brno Projekt č.19/2006/FVL.

Prostorová a časová dynamika distribuce enzymových aktivit v lesních půdách ve vztahu k půdním houbám

Baldrian P., Šnajdr J., Valášková V., Cajthaml T., Merhautová V.

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Václavská 1083, 14220 Praha 4, Česká republika

Extracelulární enzymy štěpící polymery obsažené v buněčné stěně rostlin – lignin, celulózu a hemicelulózu – participují na přeměně půdní organické hmoty, zejména rostlinného opadu a humusových látek ve svrchních vrstvách půd. Aktivita lakázy, Mn-peroxidázy, endo-1,4- β -glukanázy, endo-1,4- β -xylanázy, cellobiohydrolázy, β -glukosidázy a β -xylosidázy v lesní půdě (s dominantním *Quercus* sp.) byla v průběhu roku silně, ale nikoli konsistentně variabilní. Aktivita enzymů klesala s hloubkou půdy, podobně jako biomasa hub a poměr biomasy hub a bakterií. Prostorová distribuce všech enzymů v horizontech L (opad) a O (humusový) vykazovala místa s nízkou, ale i velmi vysokou aktivitou "hotspots". Lokalizace míst se zvýšenou aktivitou v horizontech L a O byla nezávislá, někdy však souvisela s výskytem plodnic saprotrofních basidiomycet. Pouze některé enzymové aktivity pozitivně korelovaly s množstvím biomasy hub, avšak v experimentálních podmínkách vedl růst saprotrofních hub v půdě k významným změnám enzymových aktivit v kolonizované půdě, zejména u Mn-peroxidázy a lakázy. To může být jednak v důsledku produkce enzymů kolonizujícími houbami, jednak v důsledku změn mikrobiálního společenstva, ke kterým v průběhu kolonizace půdy dochází. Tato práce byla podpořena MŠMT (LC06066), MZE (QH72216) a GA AV ČR (B600200516).

Vliv antibiotika linkomycinu na bakteriální společenstvo v půdě

Čermák L., Kopecký J., Marečková M.

MBÚ AVČR Vídeňská 1083 14220 Praha

V experimentu byly sledovány změny v diverzitě bakterií v půdě ošetřené antibiotikem. Do termostatu byly umístěny dvoulitrové nádoby s dvěma typy lesních půd, které se lišily pH (kyselá a zásaditá). Půdy byly v pěti týdnech zalévány vodou s různými dávkami linkomycinu, jedno ošetření představovaly spory producenta linkomycinu – *Streptomyces lincolnensis* DSM 40355. Vzorky půd byly odebírány vždy po týdně, celkem čtyřikrát. Změny ve společenstvu byly zjišťovány metodou tRFLP. V environmentální DNA z půdních vzorků byl sledován výskyt rezistence k linkomycinu, a to pomocí PCR s použitím sond připravených podle sekvence rezistenčního genu *lmrB* ze *S. lincolnensis* a jeho homologů z databáze GenBank. Kultivovatelná složka společenstva byla sledována na dvou médiích. Bakteriální společenstva reagovala na ošetření linkomycinem rozdílně. Vyšší počty bakterií byly vykultivovány z půdy s vyšším pH. Ze všech ošetření bylo metodou PCR získáno a osekvenováno cca. 100 homologů genu *lmrB*, tyto sekvence byly následně použity ke konstrukci fylogenetického stromu. Některé sekvence vytvářely oddělené klastry. PCR produkty *lmrB* homologů byly rovněž porovnávány pomocí tRFLP analýzy. Výstup fragmentační analýzy a výsledky sekvenování navzájem korelovaly. Tento projekt je podporován Grantovou agenturou Akademie věd České republiky, granty č. IAA6020410 a IAA600200519.

Vliv vybraných pesticidů na nitrifikační a respirační aktivitu půdních mikroorganismů

Černohlávková J., Jarkovský J., Hofman J.

*RECETOX (Výzkumné centrum pro environmentální chemii a ekotoxikologii),
Masarykova Univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Česká republika,*

Půdní mikroorganismy jsou nezastupitelnou součástí půdy, podílející se na celkové úrodnosti a kvalitě půd. Používání pesticidů a přípravků na ochranu rostlin může mít kromě cílových organismů nežádoucí vedlejší vliv také na půdní mikrobiální společenstva. Cílem studie bylo posoudit vliv dvou fungicidů - dinocap (dinitrofenolový fungicid) a mancozeb (dithiocarbamát) - na respirační a nitrifikační aktivitu půdních mikroorganismů v laboratorním experimentu. Stanovením dlouhodobé respirační kinetiky půdních mikroorganismů můžeme posoudit vliv na mikrobiální aktivitu a růst společenstva. Nitrifikační aktivita je spojena s úzkou skupinou mikroorganismů citlivých k působení toxických látek. Experiment byl proveden ve dvou typech půd - orné a travní půdě. Fungicidy byly do půdy aplikovány v doporučené a 10 x vyšší aplikační dávce. Dlouhodobá respirace půdy po přidavku organického substrátu byla měřena kontinuálně pomocí OxiTop® systému po dobu 7 dnů. Z naměřených dat byly vyhodnoceny parametry respiračních křivek. Potenciální amonifikace a nitrifikace byly sledovány na začátku a po 14 dnech od aplikace fungicidů. Výsledky ukázaly změny v respirační kinetice společenstva ve vyšších dávkách fungicidů. Oba fungicidy způsobily inhibici potenciální amonifikace a nitrifikace přes 60%, po 14 dnech došlo k částečné regeneraci v nižších koncentracích. Inhibice potenciální nitrifikace až 80 % při vyšší dávce mancozebu byla ale stanovena i po 14 denní inkubaci.

Charakteristika a role mikroflóry netopýřího guana v ekologii jeskyně

Elhottová D. (1), Křišťůfek V. (1), Chroňáková A. (1), Cajthaml T. (2), Lukešová A. (1), Nováková A. (1), Kováč L. (3)

(1) Biologické centrum AVČR, v.v.i., Ústav půdní biologie, Na Sádkách 7, CZ-370 05 České Budějovice, Česká republika, (2) Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Praha 4, Česká republika, (3) Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Universita P. J. Šafárika, SK-040 01 Košice, Slovensko

Akumulace netopýřího guana v jeskynním prostředí je významným „záznamníkem“ a indikátorem biotických i abiotických změn v jeskyni, důležitým orientačním bodem pro jeskynní biota, významným potravním zdrojem včetně kolonizujícího mikrobiálního společenstva a stimulatorem diverzity biot v okolí guana. Existuje velmi málo údajů o kolonizujícím mikrobiálním společenstvu, které tvoří základnu potravní pyramidy v jeskynních, zvláště pak temperátních. Mikrobiologický výzkum jeskyní Slovenského krasu, přinesl unikátní výsledky o mikrobiálním společenstvu kopy netopýřího guana v jeskyni Domica. Bylo popsáno pět základních vrstev guanové kopy se stářím 1000 let, lišících se chemickým složením (pHCaCl 3.2 – 5.3), komplexním profilem organických látek (rozdělení sledovaných vrstev do 3 skupin: obohacené dusíkem - obohacené fosfátovými deriváty – obohacené aromatickými uhlovodíky), profilem mikroelementů, celkovou aktivní mikrobiální biomasou (15-54 nmol PLFA g⁻¹ dw), komplexní skladbou mikrobiálního společenstva (rozdělení do 4 skupin), druhovým zastoupením bakterií, aktinomycét, archeí, kvasinek, mikromycét, řas a sinic. Tisíciletá kopa guana v jeskyni Domica je unikátním mikroprostředím s významným dopadem na biodiverzitu a ekologii jeskynních biot.

Phospholipid fatty acid and phospholipid etherlipid fingerprints approach to describe complex soil microbial community under impact of cattle husbandry

Elhottová D. (1), Němcová A. (1), Gattinger A. (2)

(1) Biological Centre AS CR, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic, (2) GSF-National Research Centre for Environment & Health, Institute of Soil Ecology, D-85764 Neuherberg, Germany

Complex soil microbial community of upland grassland (Borová farm, South Bohemia, Czech Republic, serving as over wintering cattle pasture), based on phospholipid ether lipid derivated isoprenoids (PLEL) and on ester-linked (EL-PLFA) and nonester-linked (NEL-PLFA) phospholipid fatty acid analyses was described. Its comparison with control soil (with low cattle impact) showed significant increase of PLEL and NEL-PLFA represented the archaea and anaerobic community, respectively. The PLEL and PLFA analyses of cattle excrements confirmed that the impacted soil was inoculated during winter period by anaerobic microflora, including archaea, originated in the cattle. The impacted soil in contrast to non impacted was enriched by following EL-PLFA (15:1w6, anteiso-13:1, 2-OH 16:0, 3-OH 16:0, 3-OH-iso-11:0), NEL-PLFA (iso-16:0, iso-15:0, 16:2) and PLEL (ip20:1, ip40:0, ip20:0) typical for the cattle excrements. The other differences consisted in higher portion of unsaturated EL-PLFA and absence of monounsaturated NEL-PLFA, high MUFA/STFA ratio, reduction of mid branched EL-PLFA and cyclopropyl EL-PLFA. These changes were more apparent in the spring period after five month cattle stay on the pasture, nevertheless the permanent shift in community composition was confirmed on severe impacted site.

Nové metody čištění DNA izolované z půdních vzorků.

Marečková M. (1), Čermák L. (1), Novotná J. (1), Forstová J. (2), Kopecký J. (1)

(1) *Mikrobiologický ústav AVČR, Praha;* (2) *Přírodovědecká fakulta UK, Praha*

DNA izolovaná z půdních vzorků je často znečištěna humínovými látkami. Následné techniky, např. PCR jsou potom inhibovány nebo probíhají nekvalitně. Zavedli jsme proto dva nové čistící postupy: 1) půda se před izolací smíchá se suspenzí CaCO₃ a dále se izoluje podle zavedeného protokolu, 2) DNA se po izolaci přečistí CaCl₂ a přes kolonku kitu pro genomovou DNA. Dále jsme vyzkoušeli přidání CaCl₂ přímo do půdy v průběhu izolace DNA. Celkem jsme porovnali sedm postupů izolování a čištění DNA. Základní izolace byly kitem Power Soil, Mobio, a metodou s fenol/chloroform/izoamylalkoholem popsanou Millerem et al. (1999). Testované metody jsme vyzkoušeli při izolaci a čištění DNA ze 14 stanovišť s velmi odlišným charakterem podloží, zrnitosti, pH, zasolení, vlhkosti, obsahu organické hmoty a vegetačního krytu. Vlastnosti stanovišť byly vztaženy k výtěžkům DNA, počtu úspěšných PCR, bakteriálním T-RFLP profilům a přímému počtu bakterií (DAPI) na stanovišti. Výtěžky DNA, PCR i diverzita společenstva podle T-RF jsou závislé na použité metodě izolace i čištění půdní DNA. Oba naše nové postupy ukazují nejspříhodnější výsledky ve všech sledovaných parametrech. Dále jsme zjistili, že výtěžky DNA jsou negativně ovlivněny v půdách s vysokým obsahem jílu, PCR je dále ovlivněno pH v půdě a počet bakterií je ve vztahu k výtěžkům DNA podle vegetačního krytu. Výsledky jsme použili k doporučení vhodných metod pro různé typy stanovišť. Práce byla podpořena granty IAA6020410 a IAA600200519 GA AVČR.

Disturbing impact of cattle husbandry on structure, function and diversity of microbial community in upland pasture soil

Elhottová D. (1), Jirout J. (1, 2), Němcová A. (1,2), Krišťůfek V. (1), Chroňáková A. (1, 2), Čuhel J. (1, 2), Šimek M. (1, 2)

(1) Biology Centre, AS CR, Institute of Soil Biology, Na Sádkách 7, CZ-370 05 České Budějovice, Czech Republic, (2) Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice, Czech Republic

Disturbing impact of cattle husbandry on structure, function and diversity of microbial community of upland pasture soil has been studied in an overwintering area located in South Bohemia. The culture-independent as well as cultivation methods indicated important shift in the community structure, namely in archaea enrichments and in actinomycetes and endomycorrhizal fungi reductions. Major functional changes caused by the cattle involved an increase of two anaerobic processes, methanogenesis and denitrification. However, nitrification activity increased significantly, too, indicating general increase in rate of nitrogen transformations. The growth of cultivable bacteria was shifted to slowly growing microorganisms, although no significant growth-stress indication was observed. On the other hand, the growth of cultivable saprotrophic fungi was shifted to rapidly growing microorganisms. The diversity increased on complex community level (PLFA/PLEL profile), as well as on level of cultivable bacteria (MIS Sherlock) and saprotrophic fungi (cultivation, microscopy, morphological keys determination). Structural and some functional changes were roughly related to the extent of cattle impact being usually most pronounced in severely impacted soil, although the highest community diversity was found in moderately impacted soil. The majority of observed changes in severely impacted soil was permanent; in contrast microbial community in moderately impacted soil showed higher resilience.

Společenstvo archeí v netopýřím guanu v jeskyni Domica (NP Slovenský Kras)

Chroňáková A. (1, 2), Petrásek J. (1), Krišťůfek V. (1), Elhottová D. (1)

(1) Biologické centrum AV ČR, v. v. i. - Ústav půdní biologie, Na Sádkách, CZ-370 05 České Budějovice, Česká republika, (2) Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice, Česká republika

Metodami nezávislými na kultivaci bylo studováno společenstvo archeí netopýřího guana v jeskyni Domica (NP Slovenský kras, Slovenská republika). Kopa netopýřího guana vznikla převážně aktivitou vrápence jižního (*Rhinolophus euryale*), který vytváří v jeskyni početné kolonie (1 – 2 tisíc ks). DNA celého mikrobiálního společenstva byla izolována ze třech povrchových odběrových míst (0 – 5 cm), která se nacházela na vrcholu kopy (G1, pH /CaCl₂ 3.2), ve střední části (G2, pH/CaCl₂ 3.2) a na úpatí (G4, pH/CaCl₂ 5.3). Ke studiu diverzity společenstva archeí a bakterií byl vybrán 16S rRNA gen. Použitím metody ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) nebyly zjištěny rozdíly ve společenstvech archeí ani bakterií mezi 3 lokalitami, ale výsledky indikovaly omezenou diverzitu prokaryotického společenstva. Byla vytvořena klonová knihovna PCR produktů 16S rRNA genu archeí z odběrových míst G2 a G4 a byla provedena fylogenetická analýza sekvencí. 79 náhodně vybraných sekvencí poskytlo 22 unikátních „fylotypů“, které byly příbuzné sekvencím netermofilních Crenarchaeota. Ani jedna sekvence nebyla příbuzná sekvencím Euryarchaeot. Dominantní skupinu (41%) tvořily sekvence příbuzné skupině sekvencí obdržných z kyselých podpovrchových vod různých prostředí. Zbýlé sekvence byly příbuzné sekvencím skupiny SCG, představujícím půdní Crenarchaeota. Výsledky ukazují na kosmopolitní výskyt archeí v různých ekosystémech naší planety.

Microbial and microarthropods participation in oak and beech litter decomposition

Jirout J. (1,2), Petrásek J.(1), Farská J. (1,2), Jínová K. (1,2), Křišťůfek V. (1), Elhottová D. (1), Starý J. (1), Rusek J. (1,2)

(1) Biology Centre AS CR, v.v.i., Institute of Soil Biology, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; (2) Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

The aim of our work was to describe the impact of simulated shift of vegetation zones to higher altitudes on the communities of microbiota and microarthropods and on the decomposition rate of allochthonous leaf litter. Litter bags filled with oak or beech leaf litter were placed into the spruce and beech forest on the Kleť Mt. (1083 m; South Bohemia). Litter bags with mesh sizes >2 mm; 0.5 mm, and $42 \mu\text{m}$ were used for certain soil biota exclusion. Litter bags were sampled six times within 3 years of field exposition. Soil microbiota (bacteria and micromycetes) were isolated using dilution plate method; total amounts were determined using epifluorescent microscopy and GC-MS, respectively. The amounts of microbiota were affected by pH or moisture. The highest abundances of soil microarthropods (Oribatida and Collembola), extracted using Tullgren funnels, were found within litterbags placed in the spruce forest. During the first year of exposition, the high microarthropod abundances were connected with increasing fungal and decreasing bacterial densities. Within 3 years of exposition, the decomposition rate was two times higher in the litterbags with the smallest mesh size, probably due to more constant conditions. After 3 years of exposition, similar amounts of litter were decomposed in each variant, despite the differences in quantity and quality of soil biota communities. We suggest the species in the higher vegetation zones are able to decompose the allochthonous leaf litter.

Odolnost betonu vůči ataku *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* a *Desulfovibrio* sp.

Luptáková A. (1), Rusín M. (2), Benada O. (3), Kofroňová O.(3), Gabriel J. (3)

(1) Ústav geotechniky SAV, Košice, Slovensko (2) Technická univerzita Košice, Slovensko (3) Mikrobiologický ústav AVČR, Praha, Česká republika

Studie popisuje makro- a mikroskopické změny vzorků betonu po působení bakterií *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* a *Desulfovibrio* sp. Vliv expozice betonových staveb vnějšmu prostředí je poměrně důležitý fenomén, který se studuje zejména u mostních pilířů, výškových staveb a staveb namáhaných v extrémních podmínkách. Bakteriální kmeny, použité v této studii byly izolovány z minerálních vod (*Desulfovibrio*) a z vod vytékajících z bývalého horního díla Smolník. Po 80-denní kultivaci vzorků betonu s bakteriálními kulturami byly zjištěny váhové úbytky (až 5%) a snížení obsahu vápníku ve vzorcích. Na povrchu vzorků byla pozorována tvorba krystalů, patrně síranu vápenatého. Elektronmikroskopické snímky potvrdily degradaci vzorků a změny v prvkovém rozložení.

Soil microbial biomass and its activity 16 years after finishing of fertilization

Malý S., Královec J.

*Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Hroznová 2, 656 06
Brno, Czech Republic*

A long-term field experiment on grassland based in 1969 was used to reveal effects of increasing level of mineral fertilization (control

Mikromycety ze svrchních vrstev lesní půdy – metabolické schopnosti a produkce oxidativních enzymů

Merhautová V. (1), Valášková V. (1), Gryndlerová H. (1), Heeg K. (2), Hofrichter M. (2), Baldrian P. (1)

(1) *Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Česká republika;* (2) *International Graduate School, Markt 23, 02763 Zittau, Germany*

Předpokládá se, že hlavními rozkladači biopolymerů ve svrchních vrstvách lesní půdy jsou houby z oddělení Basidiomycota. Aktivita oxidativních enzymů a schopnost rozkladu celulózy byla však detekována i u některých kmenů z oddělení Ascomycota. Z horizontů L (opad) a O (humusového) lesní půdy s dominantním *Quercus* sp. bylo izolováno 55 kmenů mikromycet. Identifikace isolátů byla provedena na základě morfologie a sekvenace úseků rDNA. Analýza metabolické diverzity pomocí systému FF BiologTM odhalila, že nejrychleji využívanými substráty jsou monosacharidy glukóza, fruktóza a xylóza a disacharid sacharóza. Z aminokyselin jsou nejlépe využívány alanin a kyselina glutamová, růst na karboxylových kyselinách (např. kys. jantarová a kys. fumarová) je relativně pomalý. Asi 15% isolátů produkuje enzymy oxidující fenolické látky, například guaiakol. Tyto enzymy by se potenciálně mohly podílet na přeměně ligninu a humusových látek v půdě. Práce byla podpořena MŠMT (ME 954) a GA AV ČR (B600200516).

Biodegradation of juvenogen w700 and juvenoid W330 using sand microbial isolates

Novák J. (1), Vlasáková V. (2) and Tykva R. (1)

(1) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic; (2) Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Juvenoids and juvenogens are relatively new types of insect growth regulators with high biological activities against insects and low toxicity to mammals. However, they represent an environmental risk. Therefore, it is necessary to study their fate in the environment. In this study, the biodegradation of juvenoid ethyl (cis)-N-2-4-[(2-hydroxycyclohexyl)methyl]phenoxyethyl carbamate (sign.W330) and juvenogen ethyl (cis)-N-2-4-[2-(butanoyl)oxycyclohexyl]methylphenoxyethyl carbamate (sign. W700) having biological activities against termites were studied. 15 bacterial strains and 3 moulds strains were isolated from a quarry sand used as a model subground. All strains were tested for their ability to degrade compounds W330 and W700 and 2 most active bacterial strains were selected for degradation experiments. The both selected bacterial strains were incubated in 2 ml of Na- phosphate buffer with 15 mg/l (370 kBq) of [3H] W330 or [3H] W700, resp. Degradation of [3H]- labeled compounds was analysed using radio- HPLC after 1, 3 and 7 days of incubation. Degradation of the juvenogen W700 is so fast that after 7 days it is not detected at all. Its degradation results in formation of 9 degradation products, the major of which is juvenoid W330. Degradation of W330 is not so fast. After 7 days remains 16 % of the parent compound and the degradation results in 7 degradation products. All these 7 degradation products of W330 are degradation products of W700 as well.

Possibilities of monitoring of bacterial transport through soil columns

Novák J. (1), Tykva R. (1), Klotz D. (2) and Hoque E. (2)

(1) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic; (2) Research Centre for Environment and Health, Institute of Groundwater Ecology, Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764 Neuherberg, BRD

A transport of bacterial strains through soil plays a decisive role in their distribution in subsurface layers. In this way, it can significantly influence degradation of organic compounds in the subground environment, and, thereby, also remediation of organic pollutants. Soil columns with sterile water as mobile phase represent suitable laboratory arrangement for modelling. It is desirable to detect so low amount of bacteria as possible. In this study, a transport of *Pseudomonas putida* S103, the soil isolate from quarternary gravel sample, through soil columns (50 cm long, 5 cm diameter, i.e. 981.7 cm³) was detected using spectrophotometric measurement of fractions on the soil output at 560 nm. Transport of 1.1×10^{11} of bacteria, applied on columns in 3 ml of minimal medium for bacteria was well observed. However, using inoculation of column with 1.68×10^8 of bacteria in 1 ml of minimal medium, the spectrophotometric measurement at 560 nm was not sensitive enough. Therefore, a spectrum of *Pseudomonas putida* S103 was measured. The found absorption maxima at 238 nm or 296 nm, resp., were used for spectroscopic measurement of fractions from soil columns. Using these wavelengths, transport of 3.9×10^8 bacteria through soil columns was successfully observed. Cultivation and microscopic assay were applied for confirmation with spectrophotometric measurements.

Aktivita extracelulárních enzymů a složení mikrobiálního společenstva v průběhu kolonizace půdního profilu saprotrofními basidiomycetami

Šnajdr J., Valášková V., Cajthaml T., Merhautová V., Baldrian P.

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Václavská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika

Dva kmeny saprotrofních basidiomycet - *Hypholoma fasciculare* a *Rhodocollybia butyracea* - byly izolovány z dubového lesa v Xaverově (Praha). V laboratorním experimentu jsme sledovali produkci extracelulárních enzymů a složení mikrobiálního společenstva v průběhu kolonizace rekonstruovaného půdního profilu, rozděleného do tří vrstev – O (opad), L (humusový horizont) a Ah (svrchní vrstva minerální půdy). Z ligninolýtických enzymů byla zjištěna přítomnost pouze lakázy a Mn-peroxidázy (MnP). Aktivity obou těchto enzymů klesaly se vzrůstající hloubkou, i když obě studované houby v průběhu 10 týdnů kolonizovaly celý objem půdního sloupce. Aktivity MnP, lakázy a některých hydrolýtických enzymů byly během kolonizace v prvních dvou vrstvách výrazně zvýšené ve srovnání s neinkulovanými paralelami. Nejvýrazněji se tento jev projevil u enzymu MnP, jehož aktivita vzrostla ve všech vrstvách, kdežto u ostatních enzymů byla zvýšená aktivita pozorována pouze ve vrstvě opadanky. Během kolonizace půdního profilu basidiomycetami byly výrazně ovlivněny počta půdních bakterií (CFU) a ostatních půdních hub a rovněž byla pozmeněna celková metabolická diversita půdních bakterií. Je zřejmé, že saprotrofní basidiomycety významně ovlivňují aktivitu ligninolýtických enzymů i složení mikrobiálního společenstva ve svém okolí. Práce byla podpořena GAČR (526/05/0168).

Saprotrofní houba *Hypholoma fasciculare* ovlivňuje strukturu a složení houbového a bakteriálního společenstva dřeva i půdy

Valášková V. (1), Šnajdr J. (1), Gunnewiek P. K. (2), de Boer W. (2), Baldrian P. (1)

(1) *Laboratoř biochemie dřevokazných hub, Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i, Praha, Česká Republika, valaskov@natur.cuni.cz;* (2) *Centre of Terrestrial Ecology, NIOO-KNAW, Heteren, The Netherlands*

Saprotrofní houba *Hypholoma fasciculare* je schopna kolonizovat dřevo i svrchní vrstvy lesní půdy. Cílem práce bylo zjistit, zda dochází ke změnám ve složení houbového a bakteriálního společenstva v průběhu kolonizace. Byla studována kolonizace rekonstruovaného půdního profilu a mikrobiální společenstvo v přirozených vzorcích kolonizovaného dřeva. Diverzita společenstva hub v půdě kolonizované houbou klesla o 40% vzhledem ke kontrolnímu uspořádání. Nejrozsáhlejší změny byly pozorovány v vrstvě opadu (L), kde bylo rovněž nejvíce houbové biomasy. V bakteriálním společenstvu v půdě kolonizované *H. fasciculare* byl detekován pouze jeden výrazný fylogentyp, zatímco v kontrole jich bylo přítomno velké množství bez výrazné dominance. Během analýzy bakteriálního společenstva ve dřevě kolonizované *H. fasciculare* v pozdním stadiu rozkladu bylo pozorováno pouze <10 typů morfologicky odlišných kolonií, ačkoli počet bakterií (CFU) byl vysoký, 0.2 – 7.0 10⁹/g suchého dřeva. Náhodně vybrané izoláty byly charakterizovány fyziologicky a taxonomicky. Provedená PCR/DGGE analýza potvrdila nízkou diverzitu izolátů. Studie potvrdila výrazný selekční tlak *H. fasciculare* na mikrobiální společenstvo v kolonizované půdě i dřevě. Experimenty byly provedeny za podpory FEMS Research Fellowship a GAČR (526/ 05/0168).

Growth rate regulates membrane fluidity and membrane cold adaptation in *Bacillus subtilis*

Beranová J. (1), Jemioła-Rzemińska M. (2), Elhottová D. (3), Strzałka K. (2) and Konopásek I. (1)

(1) Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, Vinicna , 12844 Prague 2, Czech Republic; (2) Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland; (3) Biology Centre of the Academy of Science of Czech Republic, Ceske Budejovice

Membrane fluidity adaptation to the growth temperature in *Bacillus subtilis* involves two distinct mechanisms: 1) long-term adaptation to low temperature accomplished by increasing the ratio of anteiso- to iso-branched fatty acids and 2) rapid desaturation of fatty acid chains in existing phospholipids by induction of fatty acid desaturase after cold shock. We studied the effect of the growth rate at optimum (40oC) and low (20oC) temperatures of cultivation on fatty acid composition, midpoint of the phospholipid phase transition (employing differential scanning calorimetry) and membrane fluidity measured by DPH fluorescence polarization. Different growth rates were attained by cultivation in complex medium with glucose or in mineral medium with either glucose or glycerol. Cells cultured at 40oC in these three media displayed the same membrane fluidity at 40oC despite a markedly different fatty acid composition. The T_m was surprisingly the highest in the case of a culture grown on complex medium. On the contrary, cultivation at 20oC in the complex medium gave rise to the highest membrane fluidity. After a temperature shift from 40 to 20oC, the cultures from all three media displayed the same adaptive induction of fatty acid desaturase despite their different membrane fluidity values immediately after cold shock.

Different way of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA and CyaA

Fišer R., Konopásek I.

Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, CZ-128 44, Prague 2, Czech Republic

The adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis* and alpha-hemolysin (HlyA) of *Escherichia coli* belong to the RTX toxin family and both toxins are known for their ability to damage biological membranes even without need for specific cellular receptors. Our study clarifies membrane disruption mechanisms of these two toxins. We employed fluorescence quenching method using liposomes with encapsulated fluorescent dye/quencher pair ANTS/DPX. In principle, there are two basic ways of vesicle disruption: 1) “All-or-none” leakage via a large-diameter pore that allows a rapid release of inner vesicle content by diffusion. 2) “Graded” leakage caused by transient narrow pores means that all vesicles are continuously losing their inner contents. Such release can be more effective for DPX (selectivity of the leakage $x > 1$), for ANTS ($x < 1$) or non-preferential ($x \approx 1$). In our study, CyaA caused graded leakage of encapsulated material with high selectivity for cationic DPX. Pore selectivity of CyaA was much higher than that of mutated toxin CyaA-E509K+E516K, the form with substitutions within predicted amphipathic alpha-helix that yielded decreased channel selectivity ($x \approx 15.7$ and $x \approx 4.9$, respectively). In contrast, HlyA induced non-preferential leakage ($x \approx 0.8$) corresponding to much broader channels. The correlation of our data with previously published results suggests that quenching method is suitable for characterization of toxin channels in vitro using fluorescence spectroscopy.

Osmoregulation in *Bacillus subtilis* under potassium limitation.

Lichá I., Ulanova D., Josefiová J., Holanová V.

Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Viničná 5, Praha 2, Czech Republic. Institute of Microbiology of Czech Academy of Sciences, Prague, Vídeňská 1083, Praha 4, Czech Republic.

The influx of potassium is supposed to be the first adaptation mechanism of bacterial cells to osmotic up-shift. In most environments the available K⁺ concentration varies and is generally low. In *E. coli* Kdp inducible high affinity system for K⁺ transport was discovered, however, the sequence homolog was not determined in *Bacillus subtilis* and other G⁺ bacteria. We have isolated and characterized *Bacillus subtilis* mutants defective in growth and osmoadaptation under limited K⁺ concentration. The non-specific transposon insertional mutagenesis was utilized for the creation of a phenotype library and two strategies to select mutants were used. Differential screening for mutants defective in growth on solid media with residual amount of K⁺ and with increased osmolarity yielded 17 mutants. When the enrichment selection in media with a K⁺ concentration below 0.5mM was employed before differential screening only single mutant was isolated. Physiological and genetic characterization of all mutants was carried out. In mutants in which only one transposon insertion was detected, the mutation was localized. In the mutant from enrichment selection, named L42, the mutation was localized to yxkO gene, a putative ribokinase, with unknown function which belongs to general stress σB operon. This fact indicates that *Bacillus subtilis* cope with potassium limitation by still unknown mechanism.

Adaptative changes in the succinate transport into mycelia of *Trichoderma viride* and cultivation on succinate as sole carbon and energy source

Olejníková P. (1), Burgstaller W. (2), Varečka L. (1), Hudecová D. (1)

(1) *Department of Biochemistry and Microbiology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic;* (2) *Institute of Microbiology, Leopold-Franzens-University Innsbruck, Technikerstrasse 25, 6020 Innsbruck, Austria*

Uptake of succinate was studied in the fungal strains *Trichoderma viride* F 534 and *Trichoderma* sp.-isolate T. Glucose-grown hyphae of these fungal strains needed an adaptation period of 10-12 hours before uptake of succinate started. Succinate-grown hyphae started to take up succinate immediately. Uptake of succinate was completely inhibited by NaN_3 (5 mmol.l⁻¹), TCS (15 $\mu\text{mol l}^{-1}$) and vanadate (1 mmol.l⁻¹). Succinate uptake showed a pH optimum at pH 5, temperature optimum at 37°C and displays the typical saturation. Competitive inhibition of succinate uptake was observed for 2-oxoglutarate in both strains, and for citrate only in the *T. viride* F 534. Succinate-grown hyphae took up 2-oxoglutarate with transport rates similar to succinate uptake. The vanadate-sensitive ATPase activity in a microsomal membrane fraction was twofold higher in succinate-grown hyphae of both strains compared to glucose-grown hyphae. The increase in vanadate-sensitive ATPase activity in succinate-grown hyphae and the inhibition of succinate uptake by an uncoupler (TCS) and by vanadate suggests that succinate uptake in these strains depends on the proton motive force. A fragment of the *T. viride* F 534 plasma membrane H⁺-ATPase gene was found. We could not demonstrate the increase of its expression during the early phase of the adaptation to succinate. This work was supported by the Slovak Grant Agency VEGA grant No.1/325/06 and APVT-20-003904

Screening of clostridium strains for butanol (acetone) production

Patáková P., Rychtera M.

Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic

Microbial solvent production is a technology that celebrates its revenue nowadays. Its increasing popularity is connected with searching for alternative energy source to oil. In our work, several *Clostridium* strains were tested for butanol production. The strains were grown anaerobically in various cultivation media, in test tubes and fermentation semi-products (acetic and butyric acids) together with end-products (ethanol, acetone and butanol) were determined by HPLC. The solvent production by *Clostridium* strains usually begins in the same moment when a sporulation starts and therefore the sporulation was observed under a microscope. Diagnostic staining according to Gram was also used because sporulation start-up can be clearly recognized by change of Gram staining from G+ to G-.

Expression of phosphatidylglycerolphosphate synthase in aerobic yeast *Kluyveromyces lactis*

Polakovičová V., Tichá E., Obernauerová M.

*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Mlynská dolina
B-2, 842 15 Bratislava, Slovensko*

Expression of phosphatidylglycerolphosphate synthase in aerobic yeast *Kluyveromyces lactis* Polakovičová V., Tichá E., Obernauerová M. Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Microbiology and Virology, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovak Republic Phosphatidylglycerolphosphate synthase (PGP synthase) catalyzes the first step in the synthesis of cardiolipin, an anionic phospholipid found in the mitochondrial inner membrane. We showed previously that the KIPGS1 gene encoding PGP synthase is essential for the viability and multiplication of the aerobic yeast *Kluyveromyces lactis*. In this study we focused on the regulation of PGP synthase expression by factors affecting mitochondrial development (carbon source, growth phase) and phospholipid precursors inositol and choline. PGS1 mRNA abundance was approximately the same during the growth in medium with glucose and glycerol/ethanol as the sole carbon source during different growth phases. The PGS1 gene expression was not altered in cells growing in the presence of inositol and choline, PGP synthase activity was reduced about 30% within 60 min following inositol supplementation. We can conclude that the regulation of the PGS1 expression in *K. lactis* is independent on mitochondrial function, as well as on general phospholipid pathway controlled by phospholipid precursors, whereas regulation of the PGP synthase activity is mediated by inositol, probably by phosphorylation.

Heterologous expression of Na⁺/H⁺ antiporters from *Zygosaccharomyces rouxii* and *Yarrowia lipolytica* increases the salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

Zimmermannova O., Papouškova K., Pribylova L., Sychrova H.

*Department of Membrane Transport, Institute of Physiology AS CR, v.v.i.,
Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic*

In all yeast species, Na⁺/H⁺ antiporters serve to maintain low intracellular concentration of toxic sodium cations or to eliminate surplus potassium from cytosol. *Saccharomyces cerevisiae* possesses one plasma-membrane antiporter (Nha1p) with broad substrate specificity to all alkali metal cations. Other yeast species, such as *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* and *Zygosaccharomyces rouxii*, dispose two types of antiporters from the NHA1 family in their plasma membranes. One of them serves mainly for the detoxification of sodium and lithium, whereas the other one helps to maintain intracellular potassium homeostasis. Heterologous expression of sodium-specific antiporters from *Y. lipolytica* and *Z. rouxii* in *S. cerevisiae* mutant cells lacking their own alkali-metal-cation efflux systems (*ena1-4Δ nha1Δ*), and subsequent estimation of antiporters' transport capacity revealed that the Na⁺/H⁺ antiporters from the two osmotolerant species transport sodium with much higher efficiency compared to *S. cerevisiae* own Nha1p. Our results show that heterologous expression of the *Y. lipolytica* and *Z. rouxii* Na⁺/H⁺ antiporters in some of *S. cerevisiae* wild-type strains can improve the salt-tolerance of cells and positively contribute to the cell growth in adverse conditions. This work was supported by Czech grants LC531, A5011407, 204/05/0028 and 206/05/0035.

Effect of commensal microflora on the induction of mucosal tolerance to birch pollen allergen in BALB/c mice

Kozakova H. (1) and Repa A. (2, 3), Stepankova R. (1), Hrnčir T. (1), Schwarzer M. (1), Hudcovic T. (1), Tlaskalova-Hogenova H. (1), Wiedermann U. (2)

(1) Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Novy Hradek, Czech Republic, (2) Department of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, Medical University of Vienna, Austria, (3) Department of Neonatology, University Children's Hospital Vienna, Austria

We studied the development of mucosal tolerance to major allergic component of birch pollen - Bet v1 in relationship to presence of intestinal microflora. Germ-free (GF) or conventionally reared (CV) BALB/c mice were intragastrically or intranasally pre-treated with Bet v 1 prior to sensitization performed by subcutaneous injections of Bet v 1 with aluminum hydroxide as adjuvans. Allergen-specific serum antibodies were determined by ELISA and allergen-specific IgE secretion was evaluated by rat basophil degranulation assay in vitro. Cellular immune response was demonstrated by spleen cell proliferation and IL-5 production was examined using ELISA kit. Allergen-specific antibody level (IgE, IgG1, IgG2a) was comparable in Bet v 1 sensitized GF and CV BALB/c mice. Oral as well as intranasal tolerance induction led to a significant reduction of allergen-specific antibody levels and IgE mediated basophil degranulation, as well as cytokine production in vitro in both GF and CV mice. We conclude that the absence of the microflora has no effect on the development of allergic responses or the ability to induce tolerance using a clinical relevant allergen. Supported by QLK3-CT-2000-000340, 303/05/2249 of the Czech Science Foundation of the Czech Republic and IAA500200710 from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Porovnání bakteriálních populací u dvou skupin SPF myši s různým průběhem experimentální kolitidy pomocí analýzy genu pro 16S rRNA

Kverka M. (1), Hudcovic T. (2), Hrnčář T. (2), Štěpánková R. (2), Bos NA. (3), Tlaskalová-Hogenová H. (1)

(1) Mikrobiologický ústav AV ČR Praha, v.v.i.; (2) Mikrobiologický ústav AV ČR Nový Hrádek, v.v.i.; (3) Department of Cell Biology, Immunology Section, University of Groningen, Groningen.

Nespecifické střevní záněty (IBD) způsobuje aberantní imunitní odpověď na antigeny střevních komenzálů. Experimentální model lidské IBD ukázal, že myši kolonizované Oxfordskou (OXF) SPF (specific-pathogen-free) mikroflórou – na rozdíl od hannoverské (HAN) – jsou citlivé k vyvolání kolitidy. Naším cílem bylo popsat a porovnat rozdíly v mikroflóře u těchto dvou typů myši. Izolovali jsme bakteriální DNA ze stolice, obsahu slepého, tenkého a tlustého střeva Balb/c myši konvenčních a kolonizovaných OXF (Sir William Dunn School of Pathology, Oxford) nebo HAN (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) SPF směsí. Analýzou genu pro 16SrRNA jsme sestavili fylogenetické stromy bakterií a navrhli 9 primerových párů pro kvantifikaci jednotlivých skupin a celkového počtu bakterií v různých částech střeva pomocí qPCR. Fylogenetická analýza ukázala, že obě SPF mikroflóry jsou komplexnější, než bylo zjištěno kultivací. Ve slepém střevě se zastoupení bakterií mezi skupinami SPF myši příliš neliší. Zatímco u HAN myši převládá osídlení jednou skupinou bakterií (lactobacily v tenkém a *R. productus* v tlustém střevě) vykazuje zastoupení bakteriálních populací u OXF myši větší diverzitu. Celkový obsah bakterií v tlustém střevě HAN myši je výrazně nižší. Studie ukazuje podrobné složení dvou SPF směsí mikroflór. Zkoumání rozdílů mezi OXF a HAN SPF směsí nám umožní najít bakterie, které se podílejí na vzniku střevního zánětu. Tyto informace by mohly být užitečné při léčbě lidského onemocnění.

Súvislosť mutácií TLR1 a TLR2 génov s vnímavosťou na MAP u hovädzieho dobytku

Mucha R., Bhide M., Čelka M., Mikula I. jr., Kišová L., Mikula I.

Univerzita Veterinárskeho Lekárstva, LBMI, Komenského 73, 041 81 Košice

Toll-like receptor 1 (TLR1) a TLR 2 patria do skupiny receptorov, ktorých úlohou je rozpoznávanie PAMP (špecifický znak patogenosti mikroba). Konkrétne TLR 2 rozpoznáva peptidoglykán gram pozitívnych baktérií a TLR1 rozpoznáva triacyl-lipoproteíny. Mutácie TLR-ov, ako bolo zistené mnohými experimentálnymi prácami, vedú k zníženej rezistencii voči bakteriálnym infekciám. Baktéria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) spôsobuje zápal gastrointestinálneho traktu, hlavne tenkého červa, pričom dochádza k zhrubnutiu jeho sliznice. Úlohou bola detekcia mutácií LRR (repetície bohaté na leucín) oblastí génov TLR1, TLR2 u hovädzieho dobytku a paralelne detekcia MAP pomocou PCR a ELISA testu. K detekcii mutácií v génoch TLR1, TLR2 bola použitá PCR reakcia na DNA a nasledovné SSCP. SNP bol potvrdený na základe DNA sekvenovania. U TLR2 sme u 781 vyšetovaných zvierat našli 6 alel, frekvencia výskytu alely TLR2_1 bola u MAP pozitívnych zvierat 41,3 % a TLR2_5 u MAP pozitívnych zvierat bolo 0%. Z toho vyplýva, že mutácia TLR2_1 zvyšuje vnímavosť voči MAP. A naopak prítomnosť TLR2_5 je spojená s rezistenciou voči MAP. U TLR1 bolo vyšetrených celkovo 476 zvierat, u ktorých sme našli 5 alel. Frekvencia výskytu u MAP pozitívnych zvierat bola pri TLR1_2 bola 100% a TLR1_3 a TLR1_4 0%. Z uvedeného vyplýva, že mutácia TLR1_2 podstatne zvyšuje vnímavosť voči MAP.

Využitie gnotobiotického modelu zvierat pri štúdiu probiotických vlastností laktobacilov

Nemcová R. (1), Gancarčíková S. (1), Mudroňová D. (1), Guba P. (1), Koščová J. (1), Sciranková Ľ. (1), Jonecová Z. (2), Bomba A. (2)

(1) Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovensko; (2) Lekárska fakulta UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 66 Košice, Slovensko

Súčasný výskum poskytuje široké možnosti pre dôkladné štúdium a získanie nových poznatkov o fyziologickom i morfológickom vývoji organizmu zvierat. Zvládnutie gnotobiologických techník a využívanie gnotobiotických zvierat pre experimentálne účely zásadným spôsobom ovplyvnilo metodický prístup vedcov k študovanej problematike. Mikroflóra má veľmi významný vplyv na vývoj makroorganizmu. Využívanie gnotobiotických zvierat pre experimentálne účely umožnilo exaktne študovať úlohu mikroorganizmov v procese funkčného a morfológického vývoja makroorganizmu, predovšetkým tráviaceho traktu. Veľmi dobré uplatnenie gnotobiotických zvierat sa ukazuje v oblasti štúdia vzájomných interakcií prirodzenej mikroflóry a patogénov tráviaceho traktu, pri štúdiu kolonizácie črevného traktu probiotickými baktériami a mechanizmu probiotického efektu mikroorganizmov, pri štúdiu vlastností probiotických mikroorganizmov a všetkých faktorov ovplyvňujúcich ich účinnosť a možnosti potencovať probiotický efekt. Táto práca sa zaoberá využitím gnotobiotických prasiat ako vhodného modelu pre štúdium inhibičného efektu probiotických baktérií so zameraním na sledovanie kolonizácie črevného traktu laktobacilmi a na štúdium interakcií laktobacilov a patogénov tráviaceho traktu konkrétne *E. coli*. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-20-062505.

Imunologicky aktivní složky mateřského mléka po úpravě pasterizací teplem a tlakem

Burianová J. (1), Kverka M. (1), Hofmanová B. (1), Houška M. (2), Měřička P. (3), Tlaskalová-Hogenová H. (1)

(1) *Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4, 14220; (2) Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Radiová 7, Praha 10, 10100; (3) Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, Hradec Králové, 50005*

Specifické i nespecifické komponenty mateřského mléka hrají velmi významnou roli v ochraně novorozence před infekcemi i v modulaci „naivního“ imunitního systému. Ze složek přirozené imunity mléko obsahuje např. lysozym a antimikrobiální peptidy, z adaptivních složek imunity např. sekreční IgA (sIgA). Význam kolostra a mléka v imunomodulaci podporuje naše studie prokazující přítomnost 32 dosud nepopsaných cytokinů v časném kolostru. Úprava mateřského mléka se používá v mléčných bankách k poskytnutí náhradní stravy novorozencům, kteří nemohou být z různých důvodů kojeni vlastní matkou. Cílem naší práce bylo porovnat biologickou aktivitu imunologicky aktivních složek mléka upraveného pasterizací teplem (62,7°C, 20 min) a tlakem (500MPa, 10 min). Zkoumali jsme baktericidní aktivitu vůči *Escherichia coli*, specifické sIgA protilátky namířené proti lyzátu bakteriálního mikroorganismu – *Bacteroides distasonis* a potravinovému antigenu – gliadinu ELISA testem a povrchový receptor pro bakteriální komponenty – CD14. V porovnání s nativním mlékem vykazovaly vzorky pasterované teplem vyšší baktericidii než vzorky pasterované tlakem. Předběžné výsledky ukazují, že po pasterizaci teplem i tlakem došlo ke zvýšení vazebné aktivity sIgA ke gliadinu i k bakteriálním antigenům. V pasterovaném mléce jsme pozorovali snížení detekovatelnosti CD14. V naší studii jsme prokázali, že úprava mateřského mléka teplem nebo tlakem před podáním novorozencům ovlivňuje aktivitu imunologických složek.

Delineating the essential AC domain portions involved in cytosolic antigen delivery by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins

Holubova J., Kamanova J., Stanek O., Sebo P.

Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Václavská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin targets primarily the myeloid phagocytic cells expressing the $\alpha M\beta 2$ integrin (CD11b/CD18) receptor. The toxin penetrates across the cytoplasmic membrane and delivers into cytosol its N-terminal catalytic AC (adenylate cyclase) domain that catalyzes unregulated conversion of cellular ATP to cAMP. Heterologous antigenic fragments can be engineered into the AC domain of genetically detoxified AC- constructs without affecting their capacity to penetrate into cells. This enables delivery of inserted immunodominant CD8+ epitopes for processing and presentation in association with MHC I molecules, thereby allowing induction of strong epitope-specific CTL responses. To delineate the essential segments of the AC domain involved in translocation and cytosolic CD8+ epitope delivery, a set of AC- proteins with different deletions in the AC domain was constructed and their capacity to deliver a model CTL epitope into antigen presenting cells was evaluated. The results show that antigen delivery capacity of AC- is conserved even upon deletion of 336 N terminal residues and is reduced when 376 N terminal residues are deleted. However, a mere deletion of residues 336–376 did not affect CD8+ epitope delivery and presentation, suggesting that several different portions of the AC domain complement each other in a synergistic manner and mediate AC domain translocation and cytosolic antigen delivery in cooperation with the rest of the CyaA molecule.

Rozdíly v průběhu vzniku kolorektálního karcinomu u konvenčních a bezmikrobních myší

Klimešová K., Rossmann P., Kverka M., Frolová L., Tlaskalová – Hogenová H.

Oddělení imunologie a gnotobiologie, Mikrobiologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Je obecně přijímáno, že existuje blízký vztah mezi chronickým zánětem a vznikem nádoru. Důležitou roli v nádorové transformaci hraje i přítomnost střevní mikroflóry. Cílem naší práce bylo popsat rozdíly v průběhu vzniku kolorektálního karcinomu v experimentálním modelu. Pro model kolorektálního karcinomu jsme použili konvenční a bezmikrobní Balb/c myši, kterým jsme podali jednu dávku azoxymethanu (10 mg/kg) a následně vyvolali zánět tlustého střeva podáváním 3% roztoku dextranulfátu sodného (DSS) v pitné vodě po dobu 5 dnů. Pro přesnější hodnocení různých stádií zánětu a vzniku kolorektálního karcinomu jsme vzorky odebírali v časových intervalech. Imunohistochemicky jsme stanovili β -katenin, který je vhodný pro sledování nádorové přeměny buněk, a indukibilní NO syntázu (iNOS). U všech myší se vyvinula chronická forma zánětu tlustého střeva, která později přecházela v dysplasi, adenom či adenokarcinom. Pomocí histologie jsme našli známky akutního zánětu v 1. týdnu po podání DSS, na který navázaly chronické změny spojené s ložiskovou atrofií krypt a nádorová transformace (od 6. týdne). Výskyt adenokarcinomu byl 30% v 6., 75% ve 12., 89% v 18. a 100% ve 24. týdnu. Cytoplasmatickou a jadernou expresi β -kateninu jsme našli v ložiscích dysplasiae a neoplasie. Cytoplasmatická hladina iNOS byla zvýšena v transformovaných buňkách. Pomocí této studie chceme lépe určit role mikroflóry při vzniku kolorektálního karcinomu a navrhnout způsoby, kterými lze tento proces ovlivnit.

Vplyv mutácií génu DRB3 (MHC-II) na vnímavosť voči paratuberkulóze u hovädzieho dobytká

Mucha R., Bhide M., Mikula I. jr., Miklušičák J., Kišová L., Mikula I. sr.

Univerzita Veterinárskeho Lekárstva, LBMI, Komenského 73, 041 81 Košice

DRB3 je vysoko polymorfny gén patriaci do skupiny MHC II (hlavný histokompatibilný komplex) receptorov, ktorých základnou funkciou je prezentácia antigénu špecifickému receptoru T lymfocytov. Z pohľadu štruktúry je DRB3 heterodimér zložený z CD4 a z receptora pre T bunky, nachádzajúci sa na povrchu bunky. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) spôsobuje zápal gastrointestinálneho traktu, hlavne tenkého červa, pričom dochádza k zhrubnutiu jeho sliznice. Zhrubnutie sliznice zapríčiní zníženie vstrebávania živín z potravy, čo má za následok úbytok hmotnosti a celkové chradnutie zvierat. Našou úlohou bola detekcia polymorfizmov génu DRB3 a štatistické vyhodnotenie spojitosti zistených polymorfizmov s výskytom MAP u hovädzieho dobytká. K detekcii mutácií v týchto génoch bola použitá PCR reakcia DNA. Produkty PCR reakcií boli použité pri SSCP analýze. U 109 vyšetovaných zvierat sme našli 20 alel, pričom frekvencia výskytu alel DRB3_2 a DRB3_14 bola u MAP pozitívnych zvierat 100%. Tieto výsledky indikujú, že prítomnosť alel DRB3_2 a DRB3_14 môže byť u hovädzieho dobytká rizikovým faktorom pre výskyt MAP infekcie. Alely DRB3_3, DRB3_7, DRB3_10, DRB3_13, DRB3_17, DRB3_18, DRB3_19 a DRB3_20 sa u MAP pozitívnych zvierat vyskytovali s frekvenciou 0%, čo indikuje preventívny efekt týchto alel voči MAP infekcii u hovädzieho dobytká.

Immune response to intradermal administration of different concentrations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen in pigs

Nechvatalova K. (1), Bernardy J. (2), Krejci J. (1), Kudlackova H. (1), Brazdova I. (2), Faldyna M. (1,2)

(1) *Veterinary Research Institute, Hudcova 70, Brno, 621 00, Czech Republic;* (2) *University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1/3, Brno, 612 42, Czech Republic*

The intradermal layer may be a more effective site for the administration of vaccines because of a high concentration of antigen-presenting cells. We focused on the determination of maximum and minimum concentrations of antigen capable to raise the antibody titre in pig sera after intradermal administration (i.d.). Piglets without antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) were used. Concentrated doses (10x, 3x) and diluted doses (100x, 20x, 10x, 3x) of a commercial vaccine against APP were administered i.d. to different groups of piglets at the age of 5 and 8 weeks. Two other groups of piglets were administered undiluted antigen i.m. and i.d., respectively. The titres of serum IgG and IgM antigen-specific antibodies were determined by isotype-specific indirect ELISA with purified APP-antigen and peroxidase conjugated Goat anti swine Ig. The antibody response was proportional up to a certain level of concentration after i.d. administration of concentrated APP antigen, but the levels of APP-specific antibodies were lower than the levels of IgG antibodies after i.m. administration of undiluted antigen. After i.d. administration of a diluted APP antigen, the detectable antibody response was induced even with a highly diluted antigen in naive animals, and the levels of antibodies in these pigs were not statistically lower than after administration of undiluted antigen. The study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZE 1B44024).

Protection of mice against challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* after vaccination with purified recombinant virulence factors

Sadílková L. (1), Nepeřený J. (2), Vrzal V. (2) and Osička R. (1)

(1) *Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague*; (2) *Bioveta Inc., Komenského 212, 683 23 Ivanovice na Hané*

Actinobacillus pleuropneumoniae is the etiological agent of porcine pleuropneumonia, an acute or chronic infection of pigs, which results in severe economic losses in the swine industry worldwide. Although a broad spectrum of immunoprophylactic preparations is offered, none of them provides complete protection. Therefore, new generations of vaccines are developed, including preparations based on purified recombinant antigens. Here we describe overproduction of several virulence factors of *A. pleuropneumoniae* that are intended to be used as important immunogenic components of a new recombinant subunit vaccine against porcine pleuropneumoniae in recombinant *Escherichia coli* cells and demonstrate their protective effects in a mouse model. Genes encoding virulence factors ApxI, ApxII, ApxIII and TbpB were amplified from the total gDNA of *A. pleuropneumoniae* by PCR and cloned into the expression vector under the control of strong translation initiation signals of gene 10 of bacteriophage T7 and placed under the control of an inducible T7 promoter. All four proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells and purified by ion exchange and affinity chromatography. The yields of the purified recombinant proteins ranged from 10 to 30 mg per one liter of cell culture and the protein purity was over 90%. Vaccination of mice with purified recombinant virulence factors offered almost complete protection against challenge with field strains of *A. pleuropneumoniae* serovar 7 and 11.

Oligonucleotide microarray analysis of a porcine macrophage reaction to in vitro salmonella infection

Pavlova B. (1, 2), Matiasovic J. (2), Crhanova M. (1) (2), Rychlik I. (2, 3), Faldyna M. (2) (3)

(1) Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno; (2) Veterinary Research Institute, Brno; (3) University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Institute of Microbiology and Immunology, Brno.

In salmonellosis pathogenesis, interaction between macrophage and Salmonella seems to play a crucial role in development of the disease. Most of the studies concerning the molecular events during macrophage-Salmonella interaction originate from infection experiments using mouse or human isolated cells or cell lines. Therefore, the aim of our study was to extend the knowledge about this interaction in pigs. Permanent porcine macrophage cell line 3D4/31 was infected with Salmonella enterica serovar enteritidis for 6 hours. Total RNA was isolated using TRI reagent and reverse transcribed with oligo dT primer using LabelStar Array Kit. cDNA was labeled with cyanine 3 (Cy3) and cyanine 5 (Cy5) dCTP. Microarray slides were spotted with 237 oligonucleotides (Operon), selected for genes corresponding to immune response. Labeled cDNA molecules were simultaneously hybridized to microarray slide and subsequently detected with the fluorescent reporter molecule Cy3 and Cy5, respectively, in a Perkin Elmer ScanArray Express apparatus. It was found that in vitro stimulation of porcine macrophage cell line 3D4/31 with Salmonella enterica serovar enteritidis is responsible for expression (e.g. IL-8, IL-1 α , GM-CSF and neurotrophic factor) and suppression (e.g. 90-kDa heat shock protein and matrix metalloproteinase-13) of different genes. The study was supported by the Ministry of Agriculture of Czech Republic (0002716201).

Peyer's patch B cell compartment development in conventional and gnotobiotic piglets

Samankova P. (1), Sinkora J. (2), Rehakova Z. (3), Leva L. (1), Faldyna M. (1)

(1) Veterinary Research Institute, Brno, CR; (2) Guest researcher; (3) University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove, CR.

Anatomically, Peyer's patches (PP) are the most distinctive structure within the gut-associated lymphoid tissue (GALT) and begin to form during prenatal period. The role of PP as a primary B-lymphopoietic centre in pigs has long been a matter of discussion. In our work we have tried to shed more light on the role of PP in B-cell development and humoral immunity induction by comparing phenotype profiles of cells isolated from PP, lymph nodes, spleen, bone marrow and blood. Cell suspensions and tissue sections were stained with HM57 MoAb cross-reactive with an intracellular epitope of CD79 in many species and MoAb specific for antigens present on B-cells (anti- CD1, CD2, CD21, CD45RA, CD45RC, CD172 α , SWC7, IgA, IgG, IgM). Binding of primary MoAb was visualized with isotype-specific indirect immunofluorescence and analyzed by polychromatic flow cytometry and fluorescent microscopy. Postnatal development of PP was studied in newborns, piglets before and after weaning and in adult pigs. The role of microflora in PP development was studied by comparing the results in CV and GB piglets. We have characterized major stages of primary B lymphopoiesis occurring in bone marrow and, with the probability almost equal to certainty proved PP not to be a primary center. We have also found differentiation stages corresponding to well-characterized human counterparts (e.g. CD21hi marginal zone B cells). This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (0002716201).

Selection and characterization of single chain variable fragments against capsid protein of Porcine circovirus 2

Trundová M., Celer V., Molínková D.

Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno

Porcine circovirus 2 infections have been strongly correlated as a causative agent of economically important disease of pigs worldwide. The main goal of this work was selection and characterization of specific single-chain variable fragment (scFv) antibodies against PCV-2 capsid protein. For scFv generation, Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I +J) were used. Panning was performed against recombinant capsid protein in three rounds. Gained recombinant phages from each round of panning were multiplied in *E. coli* TG1 cells. Reactivity and specificity of the isolated clones was investigated by monoclonal ELISA and Western blotting. Sequence analyses of the several clones with strong binding ability to the capsid protein demonstrated that at least three different clones were selected, however all of them contained amber stop codon within their reading framework. To solve this problem, *E. coli* HB2151 cells were infected with recombinant phages and only clones expressing soluble scFvs which reacted with capsid protein, were selected for further analyses. 17 clones were isolated and further characterized by sequencing and Western blot analysis. Prepared scFv antibodies against PCV-2 could be used for the construction of novel diagnostic tests and for research purposes. This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, Grant no. 524/06/1640.

Cytokine response of porcine cell lines to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its *hilA* and *ssrA* mutants

Volf J., Faldyna M., Pavlova B., Rychlik I.

Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is a facultative intracellular bacterium which can infect and colonise pigs. After contact with enterocytes and macrophages, *S. Typhimurium* induced production of cytokines thus triggering innate immune response. In this study we evaluated cytokine response of two porcine cell lines, IPI2I and 3D4/31, of epithelial or macrophage origins respectively, to the wild type *S. Typhimurium* and its *hilA* and *ssrA* mutants. We observed that the 3D4/31 cell line essentially did not respond to *S. Typhimurium* infection regardless of the strain and mutation. In IPI2I, $TNF\alpha$, IL8 and GM-CSF were stimulated by the wild type *S. Typhimurium* as measured by mRNA quantification by the real time RT-PCR. *ssrA* mutant also induced all the cytokines although the induction of $TNF\alpha$ was lower than that induced by the wild type strain. *hilA* mutant was unable to induce any of the cytokines tested. *ssrA* mutant can be therefore considered as a more suitable for further vaccine development since the stimulation of innate immune response is important for animal protection against a challenge with virulent strains.

Nitric oxide production by rat, bovine and porcine macrophages

Zelnickova P. (1, 2), Matiasovic J. (1), Pavlova B. (1, 3), Kudlackova H. (1), Kovaru F. (4), Faldyna M. (1, 2)

(1) Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic; (2) Institute of Microbiology and Immunology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic; (3) Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska, Brno, Czech Republic; (4) Institute of Physiology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

The aim of this work was to compare NO production by rat, bovine and porcine tissue macrophages under in vitro conditions. NO production was induced by lipopolysaccharide (LPS) or by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) with ionomycin. Some samples were stimulated with recombinant porcine interferon gamma (rIFN- γ). NO production was assessed by Griess reaction. iNOS expression on mRNA and protein level was quantified by immunocytochemistry, Western blotting and real-time PCR. NO production by macrophages of all tested species differed. The higher amounts of NO were produced by rat PAM. Less NO was produced by bovine PAM. Moreover PAM of rat and cow differed in their ability to respond to different stimulators. While rat PAM produced NO after LPS stimulation only, bovine PAM produced NO after stimulation with either LPS or PMA and ionomycin. Neither porcine PAM nor KC produced NO under conditions, which were sufficient for induction of NO production in rat and cow PAM. Additionally stimulation of porcine PAM with other concentrations of LPS did not lead to induction of NO production in these cells. When porcine PAM were stimulated with rIFN- γ together with LPS, significant increase in iNOS mRNA expression occurred however without detectable iNOS expression on protein level or NO production measured by Griess reaction. Supported by grants Ministry of Agriculture of the Czech Republic 0002716201, Czech Science Foundation 524/05/0267 and MSM 6215712403.

Epidemie puchýřnatého onemocnění novorozenců vyvolané kmeny *Staphylococcus aureus*

Machová I. (1), Petráš P. (1), Růžičková V. (2)

(1) Státní zdravotní ústav, CEM, NRL pro stafylokoky, Praha; (2) Přítrodovědná fakulta Masarykovy univerzity, Brno

Staphylococcus aureus je jedním z nejzávažnějších humánních patogenů. Některé kmeny *S. aureus* mohou produkovat exfoliativní toxiny (exfoliatiny), které způsobují kožní infekce u lidí a zvířat. V NRL pro stafylokoky jsme pracovali v posledním roce na třech epidemiích pemphigus neonatorum, vyvolané kmeny *S. aureus* s produkcí exfoliatinů. Epidemie 1: Celkem bylo vyšetřeno 38 kmenů. Epidemický kmen vyvolávající onemocnění byl hyperproducentem exf. A s fagotypem 47,75. Tento kmen byl identifikován u 12 z 18 dětí a u jedné ze sester sloužící na novorozeneckém oddělení. Epidemie 2: Celkem bylo vyšetřeno 102 kmenů. Všech 16 kmenů od novorozenců bylo pozitivních na produkci exf. A a B a patřilo do fágové skupiny II. (fagotyp 3C, 55). Stejný kmen byl identifikován i u zdravotní sestry na novorozeneckém oddělení. Epidemie 3: Celkem bylo vyšetřeno 27 kmenů *S. aureus*. Epidemický kmen se silnou produkcí exf.A, fagotyp 47,75 byl identifikován ze stěrů puchýřů a spojivkového vaku všech novorozenců. Tentýž kmen byl identifikován i z výtěru nosu sestry 1 a ze stěru z perinea sestry 2. I přes nalezení případných nosičů epidemických kmenů v nemocnicích, po jejich přeléčení a důkladné dezinfekci celého oddělení se po určité době onemocnění projevilo znovu.

Klinický význam hemokultivace v praxi - rezervy, přehled a kasuistiky.

Malotová D.

Laboratoř klinické mikrobiologie, s.r.o. Šternberk

Infekce krevního řečiště lze charakterizovat přítomností bakterií v krevním oběhu (bakteriemií), která má významnou asociaci s klinickým stavem pacienta, jednoznačnými markery bakteriální infekce a systémové odpovědi makroorganismu. Zlatým vyšetřovacím standardem je odběr hemokultur, v dnešní době již, do komerčně vyráběných hemokultivačních nádobek s médiem, které jsou kultivovány v automatech. Kdy a kolik vzorků odebrat, v jakém odstupu a podobně je stále diskutováno. V přednášce uvádím přehled praxe v naší nemocnici, metodický pokyn zpracování a vyhodnocení materiálu, absolutní počet vzorků za poslední 2 roky, % pozitivních nálezů, přehled patogenů a 3 zajímavé kasuistiky.

”Čisté prostory” (operační sály, ...) ve zdravotnických zařízeních

Matoušková I., Halfřová R., Janout V., Vítoslavská B.

Zdravotní ústav se sídlem v Olomouci, Wolkerova 74/6, 772 01 Olomouc

Čisté prostory ve zdravotnických zařízeních představují především operační sály, zákrokové sály a podobná zařízení. Tyto prostory vyžadují speciální přístup zdravotnického personálu a speciální způsoby dekontaminace těchto prostorů. V mnoha případech se jedná také o čisté prostory určené pro imunosuprimované pacienty na hemato-onkologických, treansplantačních a novorozeneckých odděleních. V přednášce bude diskutována problematika mikrobiologické i částicové kontaminace těchto prostorů.

Proteínový profil izolátov *Pseudomonas* spp.

Melková R. (1), Hošťacká A. (1), Štefkovičová M. (2), Rosinský J. (3), Čížnár I. (1)

(1) Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 01 Bratislava, Slovenská republika; (2) Regionálny úrad verejného zdravotníctva, Nemocničná 4, 911 01 Trenčín, Slovenská republika; (3) Regionálny úrad verejného zdravotníctva, Mederčská 39, 945 75 Komárno, Slovenská republika

V rámci riešenia projektu Ministerstva zdravotníctva SR č. 2005/ 24-SZU-02 sme sledovali a porovnali proteínový profil 33 kmeňov *Pseudomonas* spp. Jednalo sa o 8 kmeňov *Pseudomonas* species ďalej neurčených, jeden kmeň *P. pseudoalcaligenes*, 2 kmene *P. fluorescens* a 22 kmeňov *P. aeruginosa*. Kmene boli izolované zo zavedených kanýl, drenáží, zo sterov z rany a pod. (13 izolovaných kmeňov) od pacientov, z nemocničného prostredia a prostredia zubných ambulancií (14 izolovaných kmeňov) ale aj z vonkajšieho prostredia – (6 kmeňov izolovaných z povrchových vôd Dunaja a Váhu). Zo sledovaných kmeňov sme izolovali celobunkové proteíny a analyzovali sme ich SDS-PAGE. Proteínové profily *P. pseudoalcaligenes*, *P. fluorescens* a *P. aeruginosa* sa navzájom odlišovali. Tri izoláty *Pseudomonas* spp. mali proteínový profil podobný s proteínovým profilom *P. aeruginosa* a jeden izolát *Pseudomonas* spp. mal proteínový profil podobný s profilom *P. fluorescens*. V rámci kmeňov *P. aeruginosa* sme medzi izolátmi tiež pozorovali variabilitu proteínových profilov, ktoré sa líšili nielen kvalitatívne na základe molekulovej hmotnosti niektorých proteínových frakcií ale aj kvantitatívne.

Genotypizace kampylobakterů

Purkrtová S., Šabatková Z., Demnerová K., Pazlarová J.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28, Praha 6

Enteropatogenní termofilní bakterie rodu *Campylobacter*, *C. jejuni* a *C. coli*, jsou původci průjmového onemocnění, jehož výskyt se v průmyslových zemích trvale zvyšuje. Tyto bakterie patří mezi běžné osídlení zažívacího traktu zvířat a nejčastějším zdrojem nákazy je syrové maso, zvláště drůbeží. K typizaci kampylobakterií se přednostně používají genotypizační techniky, zvláště metoda RAPD s použitím REP a ERIC primerů a metoda AFLP za použití restričních endonukleas BglII a MfeI. Těmito třemi metodami jsme genotypizovali sbírku více než 50 klinických izolátů a více než 10 veterinárních izolátů. Klinické izoláty pocházely z pacientů léčených v roce 2002 ve středočeské kraji. Veterinární izoláty poskytl SZÚ v Brně. U izolátů byla vyšetřena rezistence k 11 antibiotikům (kyselina nalidixová, ciprofloxacín, tetracyklin, chloramfenikol, azithromycin, erythromycin, kanamycin, gentamicin, klindamicin, ampicilin a streptomycin). Vyskytly se rezistence ke kyselině nalidixové (32% kmenů), ciprofloxacínu (30%), ampicilinu (9%), streptomycinu (7%) a tetracyklinu (7%). Porovnali jsme rozlišovací schopnost jednotlivých metod, která byla nejvyšší u AFLP, dále u ERIC PCR a nejnižší u REP PCR. U metody AFLP jsme srovnali příbuznost jednotlivých izolátů z hlediska výskytu rezistence k jednotlivým antibiotikům. U izolátů sensitivních ke všem antibiotikům (60% kmenů) se projevila výrazně vyšší homogenita než u izolátů, které byly rezistentní k alespoň jednomu antibiotiku (40%).

Současné postavení hemokultur v diagnostice sepse

Ševčíková A.

OKM, FN Brno

Těžká seps s vysokou mortalitou zůstává častou komplikací s prevalencí asi 3 promile. Současně se předpokládá každoroční nárůst počtu případů těžké sepse o 1,5%. Jako příčina je uváděno stárnutí populace, se kterým souvisí stoupající výskyt pacientů s potřebou intervenčních zákroků, pacientů s nádorovým onemocněním, pacientů s poruchou imunity a současně se zhoršující situace v oblasti antibiotické rezistence. Stoupající počet vyšetřovaných hemokultur pozorujeme i v naší nemocnici. Nejčastějším místem vzniku infekce jsou plíce, intraabdominální oblast a uropoetický systém. Terapie je komplexní a musí mimo okamžité empirické nasazení ATB obsahovat další podpůrnou terapii. Snahou mikrobiologické laboratoře je přispět co nejrychleji ke stanovení etiologického agens, jeho citlivosti na antibiotika a doporučit úpravu antibiotické terapie s ohledem na maximální účinnost a minimální vliv na nárůst rezistence.

Detekce klinicky významných bakterií v ortopedickém materiálu pomocí metody multiplex PCR

Žaloudíková B., Freiburger T., Růžička F.

*Genetická laboratoř, Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie
CKTCH, Výstavní 17/19, 603 00 Brno*

Diagnostika artritid je založená především na cytologickém, biochemickém a mikrobiologickém vyšetření synoviální tekutiny postiženého kloubu. U artritid infekčního původu je standardní metodou mikrobiologického vyšetření kultivace, přičemž nejčastěji detekovaným agens jsou stafylokoky. U pacientů s probíhající antibiotickou léčbou jsou však výsledky kultivace nečíska falešně negativní. Molekulárně-biologické metody založené na PCR umožňují detekci širokého spektra bakterií nezávisle na podávané antibiotické léčbě a náročnosti mikroba na kultivaci. V období mezi 05/2005 a 05/2007 bylo v naší laboratoři metodou univerzální PCR s následnou sekvenací vyšetřeno celkem 168 punktátů z kloubů, s pozitivním výsledkem v 53 případech (32 %). Ve vzorcích byly detekovány převážně stafylokoky (57 %) a streptokoky (19 %), ale i další zástupci G+ i G- bakterií (24 %). Na základě těchto výsledků jsme zavedli metodu multiplexní PCR zaměřenou na i) oblast genomu specifickou pro stafylokoky, ii) gen *femB* specifický pro *S. aureus* a iii) gen *mecA* způsobující rezistenci k methicilinu. Citlivost a specificita nové metody byla testována na sbírkových kmenech stafylokoků. Pro ověření použitelnosti metody v klinické praxi bylo testováno 50 vybraných vzorků punktátů u pacientů s artritidou různé etiologie. Multiplexní PCR se ukázala být rychlou, spolehlivou a senzitivní metodou pro detekci stafylokoků v kloubních punktátech, včetně určení methicilinové rezistence.

Yersinia outer proteins (Yops) of *Y. enterocolitica* inhibit antigen degradation in dendritic cells

Adkins I. (1), Köberle M. (2), Gröbner S. (2), Autenrieth S.E. (2), Borgmann S. (2), Autenrieth I.B. (2)

(1) Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic; (2) Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Eberhard-Karls-University, Tübingen, Germany

Yersinia outer protein P (YopP) of *Yersinia enterocolitica* inhibits antigen (Ag) uptake in dendritic cells (DC). Here, we investigated whether *Y. enterocolitica* might also interfere with Ag degradation. Using two fluorescently labeled ovalbumins (OVA) as markers for Ag uptake and degradation, we found that wild-type (pYV+) as well as non-pathogenic (pYV-) *Yersinia* inhibited OVA degradation in DC. While pYV+ were located extracellularly, pYV- were internalized by DC. Microscopic analyzes of pYV-infected DC showed that only 40% of infected DC contained intracellular bacteria, and that non-infected DC degraded more OVA than pYV-infected DC. Moreover, when the internalization of pYV- was prevented by cytochalasin D, OVA degradation was no longer inhibited indicating that the competition between bacteria and OVA diminished OVA degradation in pYV-infected DC. On the contrary, cytochalasin D pre-treated DC infected with pYV+ decreased OVA degradation by a mechanism dependant on Yops. Using single Yop-translocating mutants of *Y. enterocolitica* we analyzed differential effects of YopE, YopH, YopM, YopO, YopP and YopT. However, we failed to identify a single Yop responsible for inhibition of OVA degradation in DC. As treatment with Toxin B of *C. difficile* inhibited OVA degradation in DC, we speculate that *Y. enterocolitica* might inhibit Ag degradation through multiple Yops acting together to subvert Rho GTPases which were shown to regulate Ag trafficking and processing.

Identifikace nefermentujících gramnegativních tyček : srovnání testů API GN 32 a NEFERMtestu 24

RNDr. Šárka Axmanová Ph.D, MVDr. Michaela Ziklová, Martina Žlutířová

Laboratoř klinické mikrobiologie, s.r.o. Šternberk

Přesná a včasná identifikace gramnegativních nefermentujících aerobních tyček z klinického materiálu je důležitá nejen pro léčbu, ale také pro epidemiologii. Naším cílem bylo srovnat výsledky identifikací nefermentujících gramnegativních tyček získané pomocí v ČR nejčastěji používaných komerčních setů: ID 32 GN (bioMérieux) a NEFERMtest 24 (PLIVA-Lachema Diagnostika). Z 31 kmenů nefermentujících gramnegativních vykazaly pouhé 4 kmeny totožný výsledek druhové identifikace a 10 kmenů se shodovalo pouze v zařazení do rodu. Zatímco testy ID 32 GN ukázaly ve velké většině případů velmi dobrou a dobrou kvalitu identifikace, u NEFERMtestu 24 převažovala kvalita identifikace dobrá a špatná a 12 kmenů (tj. téměř 40%) nebylo identifikováno vůbec. Nespornou výhodou ID 32 GN je skutečnost, že výsledky identifikace jsou v naprosté většině případů k dispozici již za 24 hodin na rozdíl od NEFERMtestu 24. Zatímco NEFERMtest 24 slouží k identifikaci pouze nefermentujících tyček, ID 32 GN identifikuje nefermentující tyčky i tyčky z čeledi Enterobacteriaceae, což v praxi laboratornímu pracovníkovi usnadňuje výběr identifikačního setu v případě nejistoty, zda se jedná o enterobakterii nebo oxidáza negativní nefermentující tyčku.

Characterization of prophages from *Salmonella typhimurium* strains

Drahovská H., Szemes T., Šoltýsová A., Magdolénová Z., Turňa J.

Department of Molecular biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic

Bacteriophages represent one of major mobile genetic elements that contribute significantly to horizontal gene transfer in bacterial genomes. Bacteria, including *Salmonella enterica*, may contain multiple prophages that constitute a substantial part of their genomes. Prophages contribute to the diversity in gene content in closely related salmonella strains. In presented work the sequence variability of prophage genes integrated in salmonella genomes was studied. We partially sequenced four genes of P22 phage (*gtrC*, *g8*, *eac*, *sieB*) and the *g45* gene of ST104 phage from 45 *S. Typhimurium* strains of veterinary origin. We detected 2-7 different alleles in every gene, *sieB* was the most polymorphic one. In the second part, phages induced from *Salmonella* strains were further studied. By plating on indicator strains we observed that 45 from 47 *Salmonella* strains released phages. Induced phages were characterized by PCR detection with primers targeted to genes derived from *Salmonella* phages P22, Gifsy-1, Gifsy-2, Fels-1, ST104 and $\text{SopE}\Phi$. The ST104 and ST104-related phages were confirmed to be present in phage lysates. The obtained results have shown great variability of prophages in *S. Typhimurium* and simultaneously they can be used for discrimination of closely related *S. Typhimurium* strains in epidemiologic studies.

Hodnocení výskytu MRSA ve FN Ostrava

Chmelařová E., Toršová V.

Antibiotické středisko Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Jako MRSA jsou označovány methicilin (oxacilin) rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* na základě produkce alterované transpeptidázy PBP 2a kodované na *mecA* genu. Výsledkem je rezistence ke všem betalaktamovým antibiotikům včetně kombinací s INBL a carbapenemům. MRSA jsou celosvětovým problémem. Výskyt infekcí negativně ovlivňuje velmi snadný přenos, typický pro všechny stafylokoky a obtížné odlišení kolonizace od infekce velmi komplikuje rozhodování o nasazení vhodných antibiotik. Neodůvodněné používání vankomycinu ovlivňuje selekci VRE a VISA kmenů. Eradikace jakéhokoliv typu nosičství u pacientů a zdravotnického personálu je obtížná a podílí se na endemickém výskytu kmenů na oddělení. Nejlepších výsledků v potlačování MRSA infekcí je dosaženo na základě efektivních režimových a dekolonizačních opatření, která jsou zakotvena v provozních řádech zdravotnických zařízení a vyžadují účinnou podporu managementu. Laboratorní metoda detekce MRSA je velmi citlivá a spolehlivá. Zachytí i „low level“ MRSA v heterogenní populaci. Rychlá identifikace MRSA může efektivně přispět k zahájení postupů omezujících šíření těchto kmenů. Zásadní význam má zavedení a dodržování účinných režimových opatření. Ve Fakultní nemocnici v Ostravě je výskyt MRSA sledován od roku 2000, kdy byl izolován první importovaný kmen MRSA.

Molekulárno-biologické vlastnosti patogénnych E. coli izolovaných pri rôznych klinických diagnózach

Kmetova M. (1), Havrišová K. (1), Sabol M. (1), K., Molokáčová M. (1), Takáčová V. (1), Zákuciová M. (2), Gombošová L. (2), Kerestešová A. (1), Siegfried L. (1)

(1) Ústav lekárskej mikrobiológie a klinickej mikrobiológie, (2) I. interná klinika, Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta a FN L. Pasteura, Košice, SNP 1, Slovensko

Štúdiá je zameraná na detekciu vybraných génov, kódujúcich povrchové vlastností E.coli: fimA, eaeA, bfpA, afaI, sfa, pap, pCVD432 a génov kódujúcich produkciu toxínov (α hly, cnf1, st, lt). Kmene boli izolované pri: 1.zápalových a nádorových ochoreniach gastrointestinálneho traktu (n= 434), 2. pyelonefritíde (n= 42) a 3. pri septikémií (n=20). V prvej a tretej skupine kmeňov sme zaznamenali najvyšší výskyt fimA génu, ktorý sme potvrdili pri 93,1 % a 88%. Rozdiely sa vyskytli v spektre génov, kódujúcich fimbriové a afimbriové adhezíny v skupine zápalových a nádorových ochorení čreva v závislosti od klinickej diagnózy. Najvyšší výskyt génov fimA, sfa a pCVD432 sme zaznamenali pri ulceróznej kolitíde (82%, 6 % a 1,2%). Gén bfpA sa vyskytoval iba pri Crohnovej chorobe (4%). V skupine kmeňov izolovaných pri pyelonefritíde dominoval výskyt pap génu, ktorý kóduje P fimbrie(78%). Práca bola podporená grantmi VEGA 1/4254/07, VEGA 1/2288/05 a AV 4/0027/07.

Adherencia a invazivita E. coli izolovaných pri ochoreniach gastrointestinálneho traktu

(1) Havrišová K., (1) Kmet'ová M., (1) Sabol M., (2) Gombošová L., (2) Zakuciová M., (1) Siegfried L.

(1) Ústav lekárskej mikrobiológie a klinickej mikrobiológie, (2) I. interná klinika, Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta a FN L. Pasteura, Košice, SNP 1, Slovensko

Mukóza čreva pri zápalových ochoreniach čriev (IBD) je abnormálne kolonizovaná adherentno-invazívnymi E. coli (AIEC). Z biotických materiálov od 43 pacientov s Crohnovou chorobou (CD), ulceróznou kolitídou (UC), nezápalovými ochoreniami čriev (NonIBD), neopláziami a nádorovými ochoreniami čriev (NO) sme izolovali kmene E. coli, pri ktorých sme zisťovali adherenciu a invazivitu. Schopnosť E. coli prenikať do epitelových buniek sme zisťovali pomocou gentamicínového testu invazivity. K detekcii génov adherencie a invazivity sme použili metódu PCR. Vyšetřili sme 66 vybraných kmeňov E. coli (20 pri CD, 16 pri UC, 15 pri NonIBD a 15 pri NO), ktoré sme na základe výsledkov testov zaradili ku kategórii AIEC. Najvyšší výskyt AIEC, 73 %, sme potvrdili pri NO, vysoký výskyt sme však zaznamenali aj pri IBD (35 % pri CD, 50 % pri UC). Pri NonIBD boli AIEC detegované zriedkavo (6,7 %). Pri zápalových a nádorových ochoreniach čriev sme zistili vysoké zastúpenie AIEC, čo poukazuje na ich možný vzťah k patogenéze týchto ochorení. Práca bola podporená grantom VEGA 1/4254/07.

Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from diarrhoeic calves

Kmet V. (1), Bujnakova (1), Kmetova M. (2)

(1) *Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Soltesovej 4, Kosice*; (2) *Ústav lekárskej mikrobiológie a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta UPJŠ a FN L. Pasteura, Košice, SNP 1, Slovensko*

The minimal inhibition concentration of antibiotic and virulence factors (vt1 and vt2, eae and bfp, aer, iut, iss, cva) were tested in 34 E. coli strains isolated from diarrhoeic calves from various farms. The MIC of 17 antibiotics was determined by using Midivet kit from Bel-Miditech, Slovakia. The tested E. coli strains were resistant to ampicillin and tetracycline (76%), spectinomycin (44 %), enrofloxacin (39 %), ampicillin+sulbactam (35 %), florfenicol (20 %) and gentamicin (9 %). E. coli were sensitive only to cephalosporins 3. and 4. generation, colistin and apramycin. The presence of high level fluoroquinolone resistance (CIP \geq 4mg/L and ENR \geq 16 mg/L) is related to frequent enrofloxacin application during calf scours therapy. The genes vt1 were confirmed in 68 % and vt2 in 88 % E. coli strains. The both of genes (vt1 and vt2) were demonstrated in 60% E. coli strains. The both of aerobactin associated genes (aer, iut) were detected in seven verotoxigenic E. coli strains (28%). These results confirmed, that verotoxigenic E. coli strains, isolated from diarrhoeic calves may contain also another factors of virulence, which increasing pathogenic properties of the strain. Acknowledgements. Supported by Slovak VEGA Agency (Grant No. 2/7046/27 and No. 1/4254/07)

Ribotypizace a biotypizace kmenů *Staphylococcus epidermidis* izolovaných z nemocničního prostředí

Malíková L. (1), Sedláček I. (2), Nováková D. (2), Němec M. (3)

(1) Zdravotní ústav se sídlem v Brně, Masná 3c, Brno; (2) Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Tvrdého 14, Brno; (3) Katedra mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Tvrdého 14, Brno

Kmeny rodu *Staphylococcus* získané ze stěrů z nemocničních zařízení byly identifikovány na základě biochemických vlastností do úrovně druhu. Ze sledovaného souboru byly vybrány pro bližší typizaci kmeny *Staphylococcus epidermidis*, u kterých byly testovány faktory virulence a byla provedena ribotypizace. Biotypizace *S. epidermidis* neprokázala významnou vnitrodruhovou variabilitu těchto izolátů, atypické reakce se, až na tři kmeny, nevyskytovaly. Naproti tomu výsledky ribotypizace ukázaly větší heterogenitu kmenů a jednoznačně prokázaly souvislost mezi ribotypem a místem odběru vzorků. Nalezené ribotypy se navíc v prostředí opakují v delším časovém rozmezí, což svědčí o výskytu a přetrvávání stejných kmenů podmíněně patogenních bakterií v nemocničním prostředí. Získané výsledky naznačují, že ribotypizace je vhodnou metodou umožňující precizní a spolehlivou detekci některých koaguláza-negativních stafylokoků, která má význam také pro epidemiologickou analýzu infekcí vyvolaných těmito kmeny.

Porovnání citlivostí k antibiotikům *Streptococcus agalactiae*, kmenů izolovaných z veterinárních a humánních klinických materiálů

Bzdil J. (1), Malotová D., Doláková H. (2)

(1) Státní veterinární ústav Olomouc (2) Laboratoř klinické mikrobiologie, s.r.o. Šternberk

Streptococcus agalactiae patří mezi patogeny jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. V humánní medicíně je považován zejména za původce bakteriální vaginitidy a následně u těhotných může způsobovat obávanou poporodní sepsi novorozence. Ve veterinární medicíně je etiologickým agens mastitid krav, s ekonomickým dopadem na chov. V našem projektu jsme doposud otestovali standardní diskovou difusní metodou 14 kmenů zvířecích a 50 kmenů lidských. Zajímalo nás, zda se kmeny liší v citlivosti, resp. rezistenci k antibiotikům, které běžně testujeme u lidských kmenů. Potvrdila se shoda výsledků u všech kmenů, dobrá citlivost na penicilin a výskyt rezistence u tetracyklinu a erytromycinu. V testování pokračujeme.

Could be animal strains of *S. intermedius* the source of macrolide resistance and toxin production for human staphylococcal strains?

Melter O. (1), Petráš P. (1), Machová I. (1), Jakubů V. (1), Urbášková P. (1), Kinská H. (2)

(1) National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic (2) Labvet, Clinical Veterinary Laboratory, Prague, Czech Republic

Staphylococcus intermedius is an important pathogen of animals that sporadically also colonises or infects man. As many as 248 of 252 isolates of *Staphylococcus* spp. from infected pet dogs were identified biochemically as *S. intermedius*. A large proportion of *S. intermedius* strains were susceptible to all of the clinically important antibiotics tested but 40% of the isolates were resistant to MLSB antibiotics. Amplification of the genes *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* revealed the *ermB* gene to be responsible for the resistance. An identical analysis of macrolide resistance determinants in human *S. aureus* isolates confirmed that most resistant strains had the *ermA* and *ermC* genes and not the *ermB* gene. Detection of genes responsible for toxin production (enterotoxins A, B, D, E, PVL and TSST-1) revealed sporadically the PVL determinant in animal strains. Close contact with dogs could be a risk to humans of acquiring infection with a PVL producing strain or risk factor for transmission of PVL genes from animal to human staphylococci. Identical *erm* genes in animal and human strains studied were not observed suggesting transmission of MLSB determinants is not likely between animal and human staphylococci.

Genotypizace enterotoxin H-pozitivních kmenů *Staphylococcus aureus* izolovaných z pacientů a potravin

Růžičková V. (1), Karpíšková R. (2), Pantůček R. (1), Pospíšilová M. (2), Černíková P. (1), Doškař J. (1)

(1) Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Brno (2) Státní zdravotní ústav Praha, Centrum hygieny potravinových řetězců, Brno

Stafylokokový enterotoxin H (SEH) jako jediný ze 14 nově popsanych enterotoxinů (SEG až SEV) způsobuje otravu z potravin podobně jako klasické toxiny SEA až SEE. Celkem 32 SEH-pozitivních kmenů *S. aureus* izolovaných v 11 lokalitách České republiky v letech 2002 až 2005 bylo charakterizováno analýzou polymorfismu genu *spa*, pulzní gelovou elektroforézou, ERIC2-PCR a obsahem profágů. Z 28 kmenů izolovaných z potravin pouze jeden (izolát ze sýra) byl příčinou enterotoxikózy. U 16 kmenů z potravin byl detekován pouze gen *seh*. Zbývajících 12 izolátů z potravin obsahovalo kromě genu *seh* navíc geny *seg*, *sei*, *sea*, *seb*, *sec1* a *sed*. U 4 nemocničních kmenů *S. aureus* MRSA byly detekovány geny *seh* a *sec2,3*. Southernovou hybridizací byl gen *seh* lokalizován na 171-kb *Sma*I restričním fragmentu u 21 kmenů a na 179-kb fragmentu u 11 kmenů. U izolátu ze syrového masa a dvou kmenů z polotvaru byly identifikovány dva nové *spa* typy (t2000 a t2002). Kmeny izolované z potravin byly navzájem geneticky odlišné a byly zařazeny do 20 genotypů, přestože se vyznačovaly velmi podobnými fenotypy. Čtyři kmeny MRSA, zařazené do genotypu G-21, se od MSSA kmenů z potravin lišily především makrorestričním spektrem, ERIC2-PCR a profágovým profilem. Naše výsledky dokumentují, že enterotoxin H-pozitivní kmeny *S. aureus* tvoří geneticky heterogenní skupinu kmenů a nemají společného předka. Práce byla finančně podporována následujícími projekty: MSM 0021622415, MSM 6215712402, LSHM-CT-2006-019064 a NAZV 1B53018.

Izolácia a identifikácia *Rickettsia slovaca* a *R. heilongjiangensis* v kliešťoch v regiónoch stredného Slovenska

Boldiš V., Kocianová E., Schwarzová K.

Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovensko

Rickettsie sú intracelulárne gram-negatívne baktérie, ktorých vektorom sú v našich podmienkach kliešte čeľade Ixodidae. Tieto patogény vyvolávajú predovšetkým horúčkovité ochorenia, respiračné ťažkosti a encefalitídu. V práci popisujeme izoláciu, kultiváciu a čiastočnú molekulárnu charakterizáciu izolátov *Rickettsia* spp. z kliešťov zo stredného Slovenska. V súbore 919 kliešťov sa u 73 mikroskopicky detegovali rickettsiálne mikroorganizmy. Najviac infikovaným druhom kliešťov bol *Dermacentor marginatus* (58,9%), ktorý je u nás hlavným vektorom *R. slovaca*. Hemocyty zo 41 pozitívnych kliešťov sa kultivovali vo Vero bunkách. V 17 prípadoch sa podarilo sledované agens pomnožiť v bunkových líniiach, ale iba 8 vzoriek bolo PCR pozitívnych s primermi špecifickými pre *Rickettsia* sp. Šesť hemocytovo pozitívnych homogenátov kliešťov *D. marginatus* sme naočkovali do žltkových vakov kuracích embryí. Mikroskopicky sme potvrdili jednu pozitívnu vzorku, pričom 5 homogenátov z kliešťov bolo v PCR *Rickettsia* sp. pozitívnych. Jeden homogenát bol s primermi odvodenými z génu pre 16S rRNA pozitívny na úrovni rodu *Ehrlichia* sp. Porovnaním sekvencií fragmentov génov *gltA*, *ompA* v génovej databáze vyšla pri väčšine izolátov 100% homológia s *R. slovaca*. V jednom prípade sa zistila 99% homológia s *R. heilongjiangensis*. Diagnostike rickettsiálnych infekcií sa na Slovensku nevenuje adekvátna pozornosť, preto by práca mohla prispieť k zavedeniu laboratórnej diagnostiky rickettsiôz. Projekt:VEGA 6151, 7020.

Význam priamej diagnostiky v prevencii kliešťami prenosných a chlamýdiových infekcií.

Schwarzová K. (1), Košťanová Z. (2), Margetinová J. (3), Apolen D. (3)

Virologický ústav SAV, Bratislava (1), Regionálny úrad verejného zdravotníctva, Žiar nad Hronom (2), SCPV - VÚŽV – Ústav chovu oviec, Trenčianska Teplá (3).

Kliešte môžu na človeka preniesť pôvodcov ochorení, ako kliešťová encefalitída, lymeská borelióza (LB), rickettsióza, ehrlichioza, Q-horúčka. Pri kontakte so zvieratami alebo ich výlučkami sa vzdušnou cestou môže človek infikovať hlavne coxiellami a chlamýdiami. Pri diferenciálnej diagnostike horúčok nejasnej etiológie, bakteriálnych meningitídach, artritídach, či erytémoch je potrebné uvažovať aj nad spirochetálnou, alebo chlamýdiovou infekciou. Z kliešťov *Ixodes ricinus* zo západného Slovenska sme izolovali borélie a spirochetálne baktérie, fenotypovo podobné boréliam, ktorých antigény reagovali s protilátkami niektorých pacientov s LB, ale PCR analýza neumožnila zaradiť tieto mikroorganizmy do komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l. V sledovanej lokalite sme v zimnom období odobrali výtery slizníc z nosa a papule a z plodového obalu a abortu ustajnených oviec. PCR analýza s primermi špecifickými pre *Coxiella burnetii* nepotvrdila prítomnosť DNA týchto patogénov vo vzorkách. Vo vzorkách abortu jahňata a plodového obalu matky sme zistili DNA *Chlamydia psittaci*. Infekčné agens sme vo vzorke výteru z abortu dokázali aj mikroskopicky. Výsledky sú významné z hľadiska prevencie infekcií u osôb pracujúcich so zvieratmi alebo často vystavených riziku zaklieštenia v exponovanom území. Potvrdenie prítomnosti patogénov vo vzorkách pacientov a zvierat môže prispieť ku skvalitneniu laboratórnej diagnostiky kliešťami prenosných infekcií na Slovensku. Výskum bol financovaný projektom VEGA 6151.

Porovnanie selektívnych úprav pri izolácií legionel zo vzoriek životného prostredia

Šimonyiová D., Sirotná Z., Javorová E.

Úrad verejného zdravotníctva SR, Trnavská cesta 52, 826 45 Bratislava

Kultivácia je najpoužívanejšou metódou pri stanovení legionel vo vzorkách vôd zo životného prostredia. Táto metóda však má určité obmedzenia, či už v oblasti senzitivity, kultivovateľnosti niektorých druhov, ako aj v ostatných aspektoch zabezpečenia kvality výkonu stanovenia. Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv použitých úprav pri stanovení legionel vo vzorkách vôd zo životného prostredia v podmienkach nášho laboratória. Otestovali sme vplyv použitia niektorých typov membránových filtrov, úpravy kyslým pufrovacím roztokom a tepelnej úpravy v reálnych vzorkách. Pre porovnanie výsledkov sme sledovali tento vplyv aj na simulovaných vzorkách s využitím inokula referenčného zbierkového kmeňa *Legionella pneumophila* ATCC 33152. Hodnotenie legionel sme vykonávali štandardnou ISO metódou a niektoré vzorky sme zároveň analyzovali metódami PCR. Výsledky stanovenia v reálnych vzorkách, pri použití rôznych úprav, sú značne závislé od koncentrácie legionel a koncentrácie a typu sprievodnej mikroflóry. Pri použití membránovej filtrácie sme zistili redukciu legionel až 60% a vplyv kyslej a tepelnej úpravy sa prejavil redukciami legionel v závislosti od celkového oživenia vzoriek a prítomnosti baktérií *Pseudomonas aeruginosa*.

Gardnerella vaginalis v genitálním ústrojí žen

Vydržalová M., Lysková P., Mazurová J.

*Univerzita Pardubice, Katedra biologických a biochemických věd, Štrossova 239,
530 03 Pardubice*

Výskyt *Gardnerella vaginalis* v urogenitálním traktu je spojován s močovými infekcemi, předčasnými porody, potraty, ale především s onemocněním označovaným jako bakteriální vaginóza. Přesto může být součástí poševní mikroflóry u zcela zdravých žen. Vyšetřili jsme 76 stěrů z krčku děložního náhodně vybraných žen. Z uvedeného počtu vzorků jsme mikroorganismus *Gardnerella vaginalis* vykultivovali z 23 (30,3 %) stěrů. Výsledky jsme hodnotili ve vztahu ke klinické symptomatologii, věku patientek a druhu používané antikoncepce. Izolované kmeny jsme podrobili testu citlivosti na ampicilin, erytromycin, klindamycin, chloramfenikol a penicilin. *Gardnerella vaginalis* byla ke všem uvedeným druhům antibiotik citlivá. Studie byla realizována za podpory grantu MSM 0021627502.

Funkční vztah mezi aktivitou Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu a virulencí patogenních mikroorganismů

Branny P., Nováková L., Sasková L., Pallová P., Goldová J., Lněnička P., Nádvorník R., Vomastek T.

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4

Přenos signálu u prokaryot a eukaryot se uskutečňuje zejména pomocí reverzibilní fosforylace bílkovin. U bakterií je dominantním přenosovým mechanismem tzv. dvousložkový systém sestávající ze senzorové proteinkinasy a transkripčního regulátoru. Poslední studie dokládají přítomnost genů kódujících proteinkinasy a proteinfosfatasy eukaryotního typu u mnoha bakterií a prokazují, že tyto enzymy hrají významnou roli v intracelulární signalizaci. Hlavním výzkumným tématem laboratoře je studium signálních drah sestávajících z těchto enzymů u lidských patogenních mikroorganismů. Pomocí metody DNA čipů jsme analyzovali globální profil exprese v mutantních kmenech těchto bakterií s inaktivovanými geny kódujícími proteinkinasy eukaryotního typu. Zjistili jsme, že inaktivace těchto signálních proteinů vede k významnému ovlivnění exprese řady proteinů podílejících se mimo jiné na syntéze buněčné stěny a rezistenci ke stresovým faktorům. Porovnání fosfoproteomů divokého a mutantního kmene umožnilo identifikaci potenciálních substrátů jediné proteinkinasy *Streptococcus pneumoniae*, alfa podjednotky RNA polymerasy a fosfoglukosaminmutasy, klíčového enzymu biosyntetické dráhy buněčné stěny. Tyto skutečnosti znamenají, že signální dráhy jsou potenciálním zásahovým místem pro bakteriostatická agens nové generace. Cílem projektu je určení podstaty externího signálu, pochopení molekulárních interakcí vedoucích k regulaci genové exprese a integrace funkčních komponent do signální dráhy.

SdiA a nízké pH u Salmonella

Crhánová M., Rychlík I.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství Hudcova 70 Brno, 621 00

U řady bakterií je znám mechanismus quorum sensing založený na produkci a příjmu autoinduktorů (např. N-acyl homoserin laktonů – HSL). Produkce HSL je řízena systémem LuxI/LuxR. U Salmonella byl popsán LuxR homolog SdiA; jeho funkce však není dosud plně objasněna. V promotorové oblasti genu sdiA se nachází „fur box“ – regulační sekvence specificky rozpoznávána Fur proteinem, který může být aktivován stresem. Proto jsme sledovali vliv některých stresových faktorů (např. nízkého pH) na expresi genu sdiA. Byly použity kmeny Salmonella typhimurium F98 wt a F98 sdiA mutant s transkripční promotorovou fúzí sdiA-luxCDABE. Kmeny byly kultivovány v LB médiu o různém pH a zároveň byla měřena intenzita luminescence. Ve srovnání s expresí v pH 7,5 byl sdiA v pH 4,3 indukován 2,5x více, na rozdíl od sdiA mutantního kmene. SdiA je proto zřejmě zapojen do reakce Salmonella na kyselé prostředí. Rovněž jsme sledovali vliv přídavku HSL na expresi sdiA. Ta byla bezprostředně po přídavku HSL výrazně snížena. Dále byla využita microarray analýza genomu. U Δ sdiA kmene v pH 4,3 bylo ve zvýšené míře exprimováno 5 bíčkových genů a některé geny SPI1 a SPI4 související s virulencí. SdiA proto může být zahrnut do regulace virulence v kyselém pH. U Δ sdiA kmene byla po přídavku HSL snížena exprese genů ymdF a STM1513 kódujících krátké peptidy s dosud neznámou funkcí. Podle dalších experimentů mohou být i tyto peptidy zapojeny do mechanismu quorum sensing souvisejícím se SdiA.

Regulace exprese genů BAS1 a RRN3 na translační úrovni

Černý J., Mašek T., Dubská J., Pospíšek M.

Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, ČR

V poslední době se stále více ukazuje, že regulace iniciace translace hraje významnou úlohu v modulaci genové exprese. Translace může být zahájena buď na čepičce závislou cestou, nebo některým z mnoha alternativních způsobů. Jedním z nich je zahájení translace pomocí vnitřního vazebného místa pro ribozóm (IRES). V tomto případě se malá podjednotka ribozómu váže přímo na specifický úsek 5' nepřekládané oblasti (5' UTR) bez předchozí interakce se 7mG čepičkou. Iniciace translace pomocí IRES se uplatňuje zejména u virových RNA. IRES elementy hrají nezastupitelnou roli také v iniciaci translace buněčných mRNA kódujících bílkoviny, které jsou pro buňku životně důležité. V těchto případech musí být genová exprese citlivě regulována a zároveň dostatečně silná i za podmínek, kdy jsou kanonické způsoby iniciace translace blokovány. Geny BAS1 a RRN3 kódují důležité transkripční aktivátory regulující transkripci genů, které se výrazně účastní procesu syntézy bílkovin. Prezentované výsledky byly získány na základě bicistronického testu. V něm byla 5' UTR genů BAS1 a RRN3 vložena do plazmidu pFGAL4h mezi dva reportérové geny kódující luciferázu a transkripční aktivátor Gal4p. Zvýšená míra translace druhého cistronu byla výrazně vyšší, pokud byla před něj vložena 5' UTR genu BAS1 nebo RRN3, což naznačuje, že uvedené transkripty mohou být překládány pomocí IRES. Nepřítomnost monocistronických mRNA byla testována pomocí bezpromotorového plazmidu.

Význam ostrovů patogenity u *Salmonella enterica*

Gregorová D., Šebková A., Havlíčková H., Šišák F. a Rychlík I.

Výzkuný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, Brno 621 00

Salmonella jako intracelulární patogen využívá široké spektrum faktorů virulence k překonání střevní bariéry specifického hostitele a následné vyvolání infekce. Mezi tyto faktory patří i geny kódující sekreční systém III typu, které jsou na chromozomu lokalizovány v úsecích zvaných "Salmonella pathogenicity islands" (SPI). Na prvním ostrovu patogenity jsou lokalizované geny SPI-1, které primárně ovlivňují invazi do epiteliálních buněk. Rozvoj onemocnění a intracelulární přežívání salmonel by měly kontrolovat genové úseky SPI-2, SPI-3, SPI-4 a SPI-5. Cílem naší studie bylo analyzovat úlohu jednotlivých SPI na virulenci kmenů *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Cíleně byly připraveny kmeny s jednotlivými deletovanými SPI. Pomocí transdukce fágem P22 bylo vytvořeno celkem 11 kmenů *Salmonella* Enteritidis s postupně inaktivovanými jednotlivými SPI nebo pouze s jedním aktivním SPI. U těchto kmenů byla testována schopnost adherovat a invadovat do buněčných linií IPI-21 a IPEC-2J. In vivo studie byly provedeny na BalbC myších. Invaze do tkáňových kultur byla výlučně závislá na delecí SPI-1 v jakékoliv kombinaci s dalšími SPI. Přesto in vivo byly kmeny s delecí SPI-1 pro myši plně virulentní. Přestože v testech na tkáňových kulturách nevykazovali SPI-2 mutanti odlišné vlastnosti od divokého kmene. Naproti tomu u myší byla kolonizace salmonel v játrech a slezině zcela závislá na genech kódovaných SPI-2. Úloha SPI-3, SPI-4 a SPI-5 na průběh onemocnění zůstává nadále neobjasněna.

Stability and expression of nuclear and plastome encoded genes for plastid components during drug treatment in *Euglena gracilis* and *Euglena longa*

Krajčovič J. (1), Vesteg M. (1), Takáčová M. (1), Vacula R. (1), Belicová A. (1), Schwartzbach S. D. (2)

(1) Institute of Cell Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, 842 15 Bratislava, Slovakia; (2) Department of Biology, University of Memphis, Memphis, TN 38152-3560, USA. e-mail: krajcovic@fns.uniba.sk

Growth of the phototrophic flagellate *Euglena gracilis* with various antibacterial agents leads to the permanent loss of the ability to form green colonies, bleaching. *Euglena longa*, whose plastome shares extensive similarities with *E. gracilis* ctDNA looks like a bleached mutant of *E. gracilis*. Complete sequences of both plastomes re-opened the question of a possible transformation of *E. gracilis* into *E. longa* through bleaching. To answer this question, we have compared stability and expression of nuclear and plastome encoded genes for plastid components during drug treatment in both euglenids. PCR demonstrated a time dependent loss of *E. gracilis* plastome encoded genes. Different chloroplast genes were lost at different times after drug treatment. Nuclear and mitochondrial gene levels were unaffected. In contrast to *E. gracilis* drug treatment stopped *E. longa* growth but did not produce a significant time dependent decrease in the levels of plastid genes as measured by PCR. PCR analysis using primers for 6 *E. gracilis* nuclear encoded plastid genes (*rbcS*, *petJ*, *cab*, *psbO*, *psbW* and *psbD*) and *E. longa* genomic DNA as a template followed by product sequencing showed that these genes are still present in the *E. longa* nuclear genome (homology above 90%). However RT-PCRs, real-time RT-PCRs, microarrays and Northern blot hybridization experiments with *E. longa* transcripts did not detect transcriptional activity of nuclear encoded genes for plastid proteins in *E. longa*.

Perspektivy studia na čepičce nezávislé translace v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*

Mašek T., Dubská J., Černý J., Pospíšek M.

Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Viničná 5, 128 44 Praha 2, Česká republika

Iniciace translace představuje složitý děj, jenž vrcholí sestavením 80S ribozómu na iniciačním AUG kodónu. Pro translaci většiny buněčných mRNA je nezbytná přítomnost čepičkové struktury na jejich 5'-koncích. Právě interakce koncového methylguanosinu s iniciačními faktory skupiny 4F přivádí transkript k 40S podjednotce ribozómu. Před dvaceti lety se podařilo objevit, že translace genomových RNA polioviru a viru EMCV je zahájena přímou vazbou RNA k ribozómu bez účasti iniciačních faktorů. Byl tak ustanoven první krok ke studiu vnitřních vazebných míst pro ribozóm (IRES). V současné době je známo 56 virů a 82 buněčných mRNA, u nichž iniciace translace probíhá tímto způsobem. Při studiu na čepičce nezávislé translace používáme kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocí metody DNA čipů jsme identifikovali 20 transkriptů, které se nacházejí preferenčně v polyzomální frakci buněk s nefunkční dráhou syntézy čepičkové struktury. Tento příspěvek se zabývá analýzou vybraných kandidátů pomocí bicistronických konstruktů a věnuje se kritickému zhodnocení získaných výsledků ve vztahu k současným znalostem o metodických obtížích průkazu IRES. V kvasinkách byla také studována funkčnost IRES viru hepatitidy C (HCV). Testování translační aktivity pomocí konstruktů obsahujících mutantní formy IRES prokázalo, že k iniciaci translace dochází podobným mechanismem jako u člověka. Příspěvek dále prezentuje výhody kvasinkového selekčního systému pro hledání antivirotik inhibujících translaci HCV.

Membrane translocation of Bordetella adenylate cyclase toxin promotes calcium entry into CD11b+ J774A.1 macrophage cells

Mašín J. (1, 2), Fišer R. (1, 2), Basler M. (1), Krůšek J. (3), Konopásek I. (2), Šebo P. (2)

(1) Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens, Institute of Microbiology, Prague (2) Department of Genetics and Microbiology, Charles University, Prague (3) Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology, Prague

The Bordetella adenylate cyclase toxin (CyaA) targets phagocytes expressing the CD11b/CD18 integrin, permeabilizes their membranes by forming cation-selective pores and delivers into cells adenylate cyclase enzyme that dissipates cytosolic ATP into cAMP. We describe here a third activity of CyaA that causes elevation of cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in target cells. CyaA-mediated $[Ca^{2+}]_i$ increase in CD11b+ J774A.1 cells was inhibited by extracellular La^{3+} ions but not by nifedipine, SK&F 96365, flunarizine, 2-APB, or thapsigargin, suggesting that influx of Ca^{2+} into cells was not due to opening of conventional calcium channels by cAMP or receptor signaling. Compared to intact CyaA, a CyaA-AC- toxoid unable to generate cAMP promoted transient elevation of $[Ca^{2+}]_i$. This was not due to cell permeabilization by the CyaA hemolysin pores, since a mutant exhibiting a strongly enhanced pore-forming activity but unable to deliver the AC domain into cells, was also unable to elicit $[Ca^{2+}]_i$ increase. Mutations interfering with AC translocation into cells, or deletion of the AC domain as such, reduced or ablated the $[Ca^{2+}]_i$ -elevating capacity of CyaA. Moreover, structural alterations within AC domain, due to insertion of various oligopeptides, differently modulated the kinetics and extent of Ca^{2+} influx elicited by the respective AC- toxoids. The translocating AC polypeptide appears, hence, to participate in formation of a novel type of membrane conduit for calcium ions.

Úloha genů *ybgS* a *yeaG* o neznámé funkci u *Salmonella typhimurium*

Papežová K., Rychlík I.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, Brno

Geny *yciE*, *ybgS*, *yeaG*, *yliH*, *yciG*, *ymdF* a *STM1513* jsou exprimovány ve stresových podmínkách. Přesto jejich funkce není jasná. V této práci jsme se zaměřili na dva z nich, *ybgS* a *yeaG*. Produktem genu *ybgS* je hypotetický protein, který je svojí sekvencí podobný *E. coli* homeobox proteinu, *yeaG* je domnělá serin protein kináza. V obou genech byly připraveny deleční mutanty a to v kmeni *S. Typhimurium* F98 a pro srovnání také v kmeni 8E4. Kmeny byly podrobeny zkouškám adheze, invaze a multiplikace v tkáňových kulturách, přežívání v kyselém pH, při vysychání, v přítomnosti peroxidu vodíku, žlučových kyselin, iontů a růstu v různých půdách a za různých teplot. V porovnání s divokými kmeny obě mutace (*yeaG* i *ybgS*) v obou kmenech (F98 i 8E4) vedly ke snížené schopnosti přežít při pH 4. Většina testovaných faktorů však neměla vliv na odlišné chování mutantů od divokých kmenů. Proto jsme se rozhodli srovnat mutantní kmeny pomocí microarray analýzy. U *ybgS* mutanta kmene 8E4 bylo identifikováno 8 up-regulovaných genů a 17 genů potlačených v expresi oproti divokému kmeni 8E4. U *yeaG* mutanta kmene 8E4 bylo zjištěno 44 up-regulovaných genů a 2 geny potlačené v expresi oproti divokému kmeni 8E4. Mezi geny exprimovanými v mutantu *yeaG* a *ybgS* nebyl nalezen jediný společný gen a můžeme tedy říci, že přestože oba geny byly identifikovány jako exprimované při stresu a oba vykazují shodný defekt při replikaci v kyselém pH, dopad jejich inaktivace na zbytek exprese genomu je zcela odlišný.

Charakteristika neobvyklého retron elementu u *S. enteritidis*

Pilousová L., Matiašovicová J., Rychlík I.

VUVel, Hudova 70, 621 00, Brno

Retrony jsou bakteriální retroelementy. Obsahují gen pro retron reverzní transkriptázu (*rrt*), která používá RNA transkript elementu jehož je součástí, jako templát i primer pro syntézu cDNA. Ta se hromadí v cytoplazmě bakterií a je označována jako msDNA (multicopy single stranded DNA). V naší laboratoři byl popsán zatím jediný retron, který je kódován na plazmidu a jehož produktem je dvouřetězcová molekula DNA s jednořetězcovými přesahy na 5' koncích. Cílem práce bylo objasnit způsob syntézy této molekuly. U msDNA produkujících retronů dochází k autokatalytickému sbalování transkriptu v oblasti ohraničené dvěma obrácenými repetitivy, které se nachází mezi promotorem retronu a genem *rrt*. To umožní reverzní transkriptáze rozpoznat tuto oblast a iniciovat reverzní transkripci. Proto byla oblast mezi promotorem a genem *rrt* podrobena modelaci sekundární struktury RNA pomocí programu mFold. Byly získány dva modely, které odpovídaly našim předpokladům. Na základě těchto modelů byly navrženy kombinace primerů, které by měly fungovat při PCR následující reverzní transkripci ze specifického primeru, bereme-li v úvahu schopnost M-MLV reverzní transkriptázy přeskakovat mezi řetězci RNA, pokud jsou dostatečně blízko u sebe. Těmito experimenty byla potvrzena správnost jednoho z modelů. Následovala mutační analýza, která ukázala, že sbalení RNA do této sekundární struktury je nezbytné pro syntézu DNA produktu a na základě znalosti této struktury byl navržen model jeho syntézy.

Studium jaderné funkce interleukinu-1 alfa v kvasinkách

Vicenová B. (1), Buryšková M. (2), Buryšek L. (2), Pospíšek M. (1)

(1) - Katedra genetiky a mikrobiologie, Universita Karlova Praha; (2) - GEN-TREND s.r.o., Dolní 2, České Budějovice

Interleukin-1 alfa (IL-1a) je cytokin, mezi jehož hlavní úlohy patří podpora vzniku zánětu, avšak uplatňuje se také při hematopoeze či regulaci proliferace a migrace buněk. Protein je syntetizován jako prekursor o molekulové hmotnosti 31 kDa, štěpením proteázou calpainem vzniká maturovaný IL-1a a tzv. N-terminální peptid IL-1a (NTP). Tento peptid je v rámci vyšších eukaryot vysoce konzervovaný a obsahuje jaderný lokalizační signál, díky němuž jak prekursor, tak i NTP vstupují do buněčného jádra. Jaderná funkce IL-1a prozatím nebyla objasněna, mimo savčích buněčných kultur jsou při jejím výzkumu používány také kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Již dříve jsme prokázali interakci IL-1a s komplexy histonacetyltransferáz u kvasinek a transaktivaci transkripce v UAS/GAL4 systému. Také jsme pozorovali vliv funkčního genu pro IL-1a na stabilitu expresních vektorů pravděpodobně v důsledku interakce IL-1a s kvasinkovým transkripčním aparátem. V současné době hledáme konkrétní kvasinkové proteiny, které jsou za tuto interakci zodpovědné.

Proteomová analýza nízko- a vysoko-resistentních klonů segregovaných z populace erytromycin-resistentní *Escherichia coli* rostoucí v turbidostatu v přítomnosti antibiotika

Hájková Z., Petráčková D., Kalachová L., Techniková Z., Bezoušková S., Janeček J., Weiser J.

Mikrobiologický ústav v.v.i. AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4

V poslední dekádě dochází u řady patogenních bakterií k alarmujícímu vzrůstu resistance na antibiotika díky jejich nadměrnému používání a nesprávnému dávkování. V presentované studii se zabýváme vlivem, růst neinhibující koncentrace, erytromycinu na základní fyziologické parametry populace buněk *Escherichia coli* resistantních k tomuto antibiotiku při dlouhodobé kultivaci v turbidostatu. V tomto systému, podstatně více podobnému přirozenému životnímu prostředí enterobakterií, než je tomu u klasické vsádkové kultivace, jsme sledovali profil populace buněk *E. coli* z hlediska jejich resistance k erytromycinu. V 68 hodině kultivace (cca 60 generací) jsme izolovali klon vykazující původní hladinu resistance a klon s resistencí několikrát vyšší. U obou klonů jsme pak provedli srovnání jejich proteomů. Vzorky kultur jsme pulzně označili ³⁵S metioninem a porovnali hladiny exprese proteinů, které se lišily mezi oběma klony a od původní kultury. Zjistili jsme, že v kultuře rostoucí v přítomnosti antibiotika dochází v 68 hodině k segregaci většího počtu klonů s vyšší resistencí a v průběhu další kultivace se jejich počet zvyšuje. Na konci kultivace převládají buňky s resistencí vyšší než měla původní populace. V kontrolním experimentu, kdy kultivace probíhala bez přítomnosti antibiotika se resistance buněk neměnila. Nicméně v obou kulturách se měnily další růstové parametry, jako rychlost růstu, generační doba a rychlost a přesnost translace.

Characterization of a restriction modification system from the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83:K24:H31)

Weiserová M. (1), Ryu J. (2)

(1) Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic (2) Department of Biochemistry and Microbiology, Loma Linda University, Loma Linda, CA92350, USA

We have characterised a putative restriction-modification system EcoA0ORF42P in commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83: K24: H31). This system is a functional member of the Type IB family, whose specificity differs from those of known Type IB enzymes, as proved by immunological cross-reactivity and complementation assay. Using a plasmid transformation method and RM search computer program, we have identified the DNA recognition sequence of EcoA0ORF42P as GGA(8N)ATGC. Consistently with the aa alignment data, the 3' TRD component of the recognition sequence is identical to the sequence recognized by EcoEI enzyme. The A-T (modified adenine) distance is identical to that in EcoAI and EcoEI recognition site, which also supports that this system is a Type IB member. Interestingly the recognition sequence revealed here is identical to the previously reported prototype sequence for Eco377I and its isoschizomers, which in reverse allowed us to classify these systems also as new members of Type IB family.

KIPDR1 in the control of multidrug resistance in *Kluyveromyces lactis*

Balková K., Šarinová M., Gbelská Y.

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta Katedra mikrobiológie a virológie Mlynská dolina B-2 842 15 Bratislava 4 Slovenská republika

One of the defense mechanisms that counteract chemical stress in yeast is known as multidrug resistance (MDR). MDR results from overproduction of membrane efflux pumps - ABC or MFS transporters. In the yeast *S. cerevisiae* the genes encoding multidrug transporters are under the control of the transcriptional factors Pdr1p and Pdr3p. The inspection of *K. lactis* genome sequence for transcriptional regulators involved in MDR revealed one ORF – KLLA0A0911g as an structural orthologue of *S. cerevisiae* PDR1/PDR3 genes. The KLLA0A0911g encodes a putative protein of 1082 amino acids that exhibits 21% identity and 40% similarity with the ScPDR1 gene. In this work, we isolated the gene encoding the homologue of ScPDR1 as a PCR product amplified from *K. lactis* JBD100 genomic DNA. Overexpression of KIPDR1 gene from a multicopy plasmid complemented the cycloheximide, oligomycin and fluconazole hypersensitivity of the *S. cerevisiae* mutant strain deleted in PDR1 and PDR3 genes. The presence of KIPDR1 gene on multicopy plasmid in two different *K. lactis* wild-type strains led to the increased resistance of cells to azole antifungals – fluconazole, bifonazole, ketoconazole and econazole. According to the results obtained the KIPDR1 gene is involved in the response to chemical stress in *K. lactis*. To verify the function of KIPDR1 gene in multidrug resistance the *K. lactis* pdr1 mutant was constructed. The phenotype of the Klpdr1 mutant is currently analyzed.

Srovnávací analýza genomů exfoliatin A konvertujících bakteriofágů druhu *Staphylococcus aureus*

Černíková P., Růžičková V., Pantůček R., Pekarová M., Doškar J.

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Brno

Exfoliativní toxin ETA je kódován genem eta, obsaženém v genomu fága, který je ve formě profága integrován do chromozomu hostitelské bakterie *Staphylococcus aureus*. Z klinických kmenů *S. aureus* byly izolovány tři bakteriofágy, které byly schopny lyzogenizovat netoxické kmene a změnit je na producenty exfoliatinu A. Tyto kmene získaly gen eta horizontálním přenosem zprostředkovaným fágem. Exfoliatin A konvertující fágy jsou mírné fágy, řadí se do čeledi Siphoviridae, do serologické skupiny B. U tří ETA-konvertujících fágů serologické skupiny B (531, 534, 557) byla provedena molekulární analýza vybraných genomových oblastí (geny int, ami a eta, sekvence dvou konzervativních fragmentů HindIII spektra označených jako H3 a H4). Jeden eta-pozitivní fág (435) serologické skupiny A horizontálně přenesl gen eta, avšak nekonvertoval produkci ETA u recipientního kmene. Analýzou genu int byla zjištěna sekvenční shoda části genu int fága 435 a fágů serologické skupiny B. Bylo zjištěno, že studované oblasti genomu ETA-konvertujících fágů vykazovaly sekvenční podobnost s odpovídajícími regiony DNA prototypového ETA-konvertujícího fága ETA (GenBank Acc. No. AP001553). Z analýzy genomu fága 435 vyplývá, že za určitých okolností proběhla rekombinační interakce mezi fágy serologické skupiny A a B, jejichž profágy se nacházely současně v jednom ETA-pozitivním kmenu *S. aureus*. Práce byla podporována výzkumným záměrem MSM 0021622415 a grantem LSHM-CT-2006-019064 z Evropské unie.

The analysis of the *Francisella tularensis* protein complexes using Blue Native PAGE electrophoresis

Dresler J., Klimentová J., Stulík J.

Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, Hradec Kralove, Czech Republic

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) is a relatively novel approach to high resolution separation of protein complexes in enzymatic active (native) form. In this method, Coomassie Blue G250 dye is employed as a charge-shift molecule that binds to the protein surface and gives them negative charge for their separation according to their size and/or shape. Since only mild non-ionic detergents are used and pH is maintained around 7, the subunit composition of the complexes is conserved. This approach is also very useful in the analysis of non-polar (e.g. the transmembrane) proteins which are usually underrepresented using the "classical" SDS electrophoresis. The complexes separated in the first dimension by BN-PAGE can further be broken into the corresponding subunits using the SDS electrophoresis in the second dimension. Study of complexome is essential for better understanding and more global overview of cell function. Using two dimensional 2D-BN/SDS-PAGE technology combined with mass spectrometry and western blotting, the cytosolic and membrane complexes of *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) are being analyzed. Various complexes involved in *F. tularensis* physiology were detected and their subunit architecture was confirmed. The major study is focused on the interactions of the proteins whose genes are located in the *Francisella* pathogenicity island and that exhibit common ability to support pathogen intracellular multiplication.

Lidské proteiny jako potenciální ITAF u IRES viru žloutenky typu C

Dubská J., Mašek T., Černý J., Pospíšek M.

*Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecká Fakulta, Univerzita Karlova
Viničná 5 128 44 Praha 2 Česká republika*

Virus žloutenky typu C (=HCV) je velice zákeřný virus, proti němuž doposud nebyla vynalezena účinná vakcinace. Jako jeden z možných kroků při hledání anti-virové terapie se jeví cesta přes zastavení syntézy virových proteinů. Snížení míry translace virové RNA (či ještě lépe její úplná blokace) vede totiž ke snížení počtu nasyntetizovaných proteinů potřebných pro virovou replikaci a dokončení životního cyklu viru. Syntéza proteinů viru žloutenky typu C je zahajována z vnitřního vazebného místa pro ribozóm (=IRES), které se nachází v 5' nekódující oblasti virové RNA. Funkce IRES je ovlivňována dvěma skupinami proteinů, eukaryotickými iniciačními faktory (=eIF) a IRES trans-aktivujícími faktory (=ITAF). Vliv lidských proteinů (jako možných ITAF) na IRES HCV zkoumáme v kvasinkovém kmeni pJ69a, do něhož byla vložena struktura IRES HCV v bicistronním vektoru pFGal4h a knihovna lidských genů. IRES HCV, které je vloženo mezi geny kódující luciferázu a transkripční aktivátor Gal4p je v tomto systému v kvasince plně funkční. Selektce klonů s aktivním IRES HCV tedy probíhá pomocí sekundárních reportérových genů (Ade2, His3). V současné době probíhá optimalizace selekčního systému a analýza prvních kvasinkových klonů, výsledky budou diskutovány v příspěvku.

Modulation of the susceptibility of yeast cells to antifungals

Dzugasova V., Cernicka J., Sidorova M., Drobna E., Borecka S., Batova M.,
Hikkel I., Subik J.

*Department of Microbiology and Virology, Faculty of Natural Sciences, Comenius
University in Bratislava, 842 15 Bratislava, Slovak Republic*

Multidrug resistance is a defense mechanism used by cells to survive in the presence of cytotoxic compounds. Gain-of-function mutations in PDR1 and PDR3 genes, encoding the main transcriptional activators involved in the control of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, result in increased expression of drug efflux pumps and diminished intracellular concentrations of toxic compounds. In this study we show that the susceptibility of yeast cells to antifungal agents can be modulated either by loss-of-function mutations in gene encoding Pdr3p transcription factor or by specific compounds – chemosensitizers. The chemosensitizing effect of one selected compound was demonstrated in both drug sensitive and drug resistant *Candida* species. The sensitization to antifungals of yeast cells may prove useful to combat drug resistant fungal pathogens in agriculture and medicine.

Genome-wide screening for catalase-peroxidase genes and their expression in Firmicutes and Proteobacteria

Godočiková J., Zámocký M., Bučková M., Polek B.

Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 21, 845 51 Bratislava, SK

Catalase-peroxidases are protective enzymes involved in the defence of cells against various forms of oxidative stress. They belong in the superfamily of non-animal heme peroxidases and are widely distributed among archae, bacteria and fungi. Few genes were also detected in protists (Passardi et al., 2007). The structure of katG gene coding for catalase-peroxidase is complex since it was formed by a gene duplication of an ancestral peroxidase gene. Only the N-terminal domain is responsible for catalytic activity in decomposing hydrogen peroxide and oxidising various substrates. We have screened for katG genes in the environmental samples of bacteria isolated from soil contaminated with crude oil, sludge of a wastewater treatment plant, or soil of old mines. The screening was performed via PCR on DNA samples isolated from cultivated Firmicutes and Proteobacteria. The obtained PCR products were cloned in TOPO vector and sequenced. We have found several novel genes coding for catalase-peroxidase most recently the katG gene from *Comamonas testosteroni*. This gene is phylogenetically closely related with CP genes from *Acidovorax avenae* and *Ralstonia pickettii*, both widely distributed mostly pathogenic beta-proteobacteria. Selected katG genes will be cloned in bacterial and yeast expression vectors to allow the investigation of their protective function against oxidative stress. Our research was supported by grants number APVT-51-024804 and VEGA 2/5069/25

A eukaryotic-type signaling system of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to stress resistance and intracellular survival

Goldová J. (1), Lněnička P. (1), Hercík K. (2), Branny P. (1)

(1) *Institute of Microbiology, Prague, Czech Republic; (2) National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*

Eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases are widespread in bacteria, although little is known regarding the processes they control. The genome of opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* contains at least three genes encoding Ser/Thr protein kinases, one of which, *ppkA* has been implicated in *P. aeruginosa* virulence. We have attempted to establish the role of Ser/Thr protein kinase PpkA and phosphatase PppA of *P. aeruginosa*. Despite our repeated attempts single mutants in neither *ppkA* nor *pppA* could be prepared. However, *pppA-ppkA* double mutant was viable and had a significantly reduced growth rate compared to that of the WT. Mutant strain showed a decreased resistance to different stresses such as H₂O₂-induced oxidative stress or acidic pH. Consistently, macrophage-mediated bactericidal assay showed decreased survival rate of *pppA-ppkA* mutant. To address the genetic basis of these phenotypes, we performed the transcriptome analysis of the Δ *pppA-ppkA* mutant. Comparison of the mutant and wt identified 83 genes significantly regulated by PpkA/PppA. Among them, 70 were activated and 13 repressed. Altered genes could be clustered into four regulons: 1) PrpB regulon; 2) sigma factor RpoS regulon; 3) *Pseudomonas* quinolone signal regulon; 4) oxidative stress-responsive genes. These results revealed that the *pppA-ppkA* mutation is broadly pleiotropic and affects the transcription of several sets of important genes likely related to the mutant strain phenotype.

Burkholderia cenocepacia lectin A

Malinovská L. (1), Lameignere E. (3), Sláviková M. (2), Varrot A. (3), Mitchell E.P. (4), Imberty A.(3), Wimmerová M. (1, 2)

(1) National Centre for Biomolecular Research and (2) Institute of Biochemistry, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, email: 63581@mail.muni.cz; (3) CERMAV-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble, France; (4) ESRF Experimental Division, BP 220, F-38043, Grenoble, France

Burkholderia cenocepacia is a gram negative bacterium that is ubiquitous in the environment and may evoke a number of diseases in plants. It is also the most dangerous pathogen that infects cystic fibrosis patients. Bacterial lectins may play a crucial role in an infection as they can recognize sugar moieties on host cells surface. The *B. cenocepacia* genomes contain three to four lectin-like sequences that are homologous to the lectin PA-IIL from *Pseudomonas aeruginosa*. One of these proteins - *Burkholderia cenocepacia* lectin A (BclA) - was cloned and prepared in recombination form previously. The aim of this work was to characterize this lectin and especially its binding properties. BclA is a 28 kDa dimer, in contrast to tetrameric PA-IIL. Each BclA subunit consists of 114 aminoacids. Likewise PA-IIL, BclA contains two calcium ions in its binding site and carbohydrates are bound via these ions. BclA displays different binding specificity than PA-IIL that recognizes preferentially L-fucose. BclA, as determined by enzyme linked lectin assay, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry, is D-mannose-specific. Consequently, although BclA and PA-IIL are homologues, they differ in some (and important) features. This work has been supported by Ministry of Education (MSM0021622413) and Vaincre la Mucoviscidose foundation.

Pilotní screening hypervariabilních lokusů v genomu *Treponema pallidum* u typových kmenů a klinických izolátů

Matějková P. (1), Šmajš D. (1), Woznicová V. (2)

(1) *Biologický ústav LF MU, Kamenice 5, Budova A6, Brno, 625 00, CZ;* (2)

Mikrobiologický ústav LF MU, Pekařská 53, Brno, 656 91, CZ

Na základě mapování heterologních úseků v rámci druhu *T. pallidum* s využitím metody komparativní genomové sekvenace (CGS) byly nalezeny hypervariabilní úseky v genomu *Treponema pallidum*. Jednalo se o hypotetické geny TP0136 a TP0548. Byly porovnány sekvence těchto genů u 4 skupin typových kmenů *T. pallidum*: poddruhu *pallidum* (6 kmenů způsobujících syfilis), *pertenue* (6 kmenů způsobujících yaws) a *endemicum* (1 kmen způsobující endemickou syfilis) a u 1 blíže nespécifikovaného opičího izolátu. Dále jsme měli k dispozici 9 PCR pozitivních klinických vzorků od syfilitiků. PCR pozitivita byla stanovena dvoukrokovou PCR detekcí dvou *T. pallidum* specifických lokusů (*tmpC*, *poIA*). Srovnání sekvencí genů TP0136 a TP0548 získaných Sangerovou metodou bylo vyjádřeno ve formě fylogenetického stromu a byla provedena analýza změn proteinových sekvencí. 4 skupiny typových kmenů tvoří u obou lokusů diskrétní sekvenční shluky, přičemž poddruh *pallidum* se dělí na dvě skupiny kmenů – Nichols a jemu podobné kmeny a SS14 a jemu podobné kmeny, přičemž všechny vyšetřené klinické vzorky patří do druhé skupiny. U 4 klinických vzorků došlo k záchytu materiálu sekvenčně unikátního, tedy odlišného od typových kmenů. Pokud bylo získáno více vzorků od téhož pacienta, výsledné sekvence se shodovaly. Na základě získaných výsledků lze vybrané lokusy genomu považovat za slibnou metodu pro charakterizaci klinických izolátů. Podporováno granty GAČR č. 310/07/0321 a IGA MZ ČR č. NR/8967-4/2006.

Glycosylation of the β 2 integrin receptor CD11b/CD18 is crucial for binding of Bordetella adenylate cyclase toxin

Morova J., Osicka R., Masin J., Sebo P.

*Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic,
Videnska 1083, CZ-142 20 Prague*

Adenylate cyclase toxin (CyaA) is a key virulence factor of *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough. CyaA delivers into cells a catalytic adenylate cyclase domain, which catalyzes uncontrolled conversion of ATP to cAMP, a key signaling molecule subverting cell functions. Recently, it has been demonstrated that CyaA utilizes the CD11b/CD18 integrin as a specific cellular receptor. The aim of this work was to investigate the potential role of the CD11b/CD18 integrin glycosylation in CyaA binding to CD11b+ cells. Deglycosylation of cell surface integrin molecules by specific glycosidases resulted in considerably decreased CyaA binding to Chinese hamster ovary K1 cells transfected with human CD11b/CD18, to CD11b-expressing J774A.1 murine monocytes, or to primary human neutrophils, respectively. Moreover, cAMP intoxication of the deglycosylated cells exposed to the toxin was significantly reduced. Similar results were obtained, when N-glycosylation of de novo synthesized proteins was inhibited by the antibiotic tunicamycin. Binding of CyaA to CD11b/CD18 was also significantly reduced, when free saccharides were used for inhibition experiments. Moreover, the requirement for integrin glycosylation could be demonstrated also for binding of the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, which is highly homologous to CyaA and specifically binds to target cells via another receptor of the β 2 integrin family, the CD11a/CD18 heterodimer.

Phosphorylation of RNA polymerase alpha-subunit in *Streptococcus pneumoniae*: a novel mechanism of transcription regulation?

Nováková L. (1), Sušická Z. (1), Adamec J. (2), Sasková L. (1), Branny P. (1)

(1) Institute of Microbiology, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4-Krč, 14220, Czech Republic; (2) Purdue University, Bindley Bioscience Center, 1203 W. State Street, West Lafayette, IN 47907, USA

Protein phosphorylation by protein kinases is a key mechanism that enables both eukaryotic and prokaryotic organisms to sense and read environmental signals and convert these signals into changes in gene expression and thus proper biological response. The genome of pathogenic bacteria *Streptococcus pneumoniae* encodes a single eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP. Previously we showed that StkP is important for the resistance of *S. pneumoniae* to various stress conditions and it functions as a global regulator of gene expression. Analysis of phosphoproteome maps of both wild-type and *stkP* null mutant strains labelled *in vivo* revealed a possible substrate of StkP: alpha-subunit of RNA polymerase (RNAP), a subunit which has an important regulatory role in transcription initiation. To examine functional relationship of StkP and alpha-subunit of RNA-polymerase further we purified recombinant RpoA and StkP and showed that RpoA is indeed a substrate for StkP *in vitro*. In addition, we prepared *S. pneumoniae* strain expressing His-tagged beta-subunit and we isolated native RNAP complex from exponentially growing bacteria. Phosphorylation sites in recombinant and native RpoA were identified by mass spectrometry. Our results indicate that phosphorylation of RNA polymerase alpha-subunit might represent a novel mechanism of transcription regulation in bacteria.

Analysis of the fur genes in Fur mutants overproducing pyoverdinin

Palyzová A., Valešová R., Marešová H.

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i, Vídeňská 1083, Praha 4- Krč, 142 20

The expression of components of the pyoverdinin-mediated, iron uptake system in *Pseudomonas aeruginosa*, is controlled by a mechanism in which the regulatory Fur protein plays a key role. Modification of this protein should exhibit a pleiotrophic effect on the synthesis of component of the high-affinity iron transport system. The main interest of the project is focused on a study of the correlation between the overproduction of pyoverdinin and its specific outer membrane receptor FpvA in Fur mutants FPA12 and FF13 of the strains *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and PAO-Fe10, respectively. The fur genes from mutants were sequenced and changes in the sequences of amino acids in protein-conserved regions of the protein were found: a single amino acid replacement in FF13 occurred in the region of protein involved in a DNA recognition, while that in FPA12 was identified in a Fe-binding site. These mutations affected the regulatory role of the Fur protein and the mutants produced an elevated amount of pyoverdinin.

Corynebacterium glutamicum promoters activated in stationary phase of growth

Panov A., Phensajjai M., Pátek M., Nešvera J.

*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i,
Videňská 1083, CZ-142 20 Praha 4, Czech Republic*

Promoters of the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum* activated in stationary phase of growth have been searched for. The selected promoters were cloned into the newly constructed promoter-probe vector pPRAG5 (replicating in *Escherichia coli* and *C. glutamicum*) upstream of promoterless *gfpuv* reporter gene coding for the green fluorescent protein. The vector pPRAG5 carries also the *rfp* reference gene (coding for the red fluorescent protein) under the strong constitutive promoter, which allows estimation of GFP/RFP fluorescence ratio, thus avoiding the influence of plasmid copy number variations on promoter activity assay. The resulting recombinant plasmids were transferred into *C. glutamicum* cells by electroporation and GFP/RFP fluorescence ratio was estimated during growth of the plasmid-containing cells in liquid culture. Activity of the promoters of the genes *sigE* (encoding an alternative sigma factor of RNA polymerase), *uspA1* (encoding universal stress protein) and *dps* (encoding starvation-inducible DNA-binding protein) increased significantly in the stationary phase of growth. To analyze the function of alternative sigma factors in control of *C. glutamicum* gene expression in stationary phase, inactivation of the *sigB*, *sigD*, *sigE* and *sigH* genes by specific deletions, is being performed. The effects of knockout of the individual alternative sigma factors on activity of the stationary-phase-responsive promoters will be tested.

Calcium-induced Self-processing of the RTX Protein FrpC of *Neisseria meningitidis*: Use of the Self-excising Module in Purification of Recombinant Proteins

Sadílková L., Osička R., Linhartová I. and Šebo P.

*Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic,
Václavská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic*

Purification of recombinant proteins to homogeneity is often a challenging process and typically requires several chromatographic steps that must be individually optimized for each protein of interest. To overcome this difficulty, a system that enables purification of free recombinant proteins in a single affinity chromatographic step has been developed. The system is based on a 250 amino acid residues long self-processing module of the FrpC protein of *Neisseria meningitidis* that is genetically fused at its C-terminus to an affinity tag enabling simple one-step purification and at its N-terminus to a protein of interest. Upon binding of the fusion protein to an affinity matrix and washing out of contaminating proteins, specific cleavage between amino acid residues Asp and Pro of the self-processing module is induced by calcium ions. This results in release of the free protein of interest, having only one extra amino acid residue (Asp) at its C-terminus. The self-processing module - affinity tag fusion partner remains trapped on the affinity matrix. This system has been successfully tested with several proteins of interest (adenylate cyclase, chloramphenicol acetyltransferase, tetrameric β -galactosidase, maltose-binding protein, or glutathione-S-transferase, luciferase, or the RPSOA protein of the 40S ribosomal subunit of *Saccharomyces cerevisiae*) and two different affinity tags (chitin-binding domain, or poly-His).

Srovnání pyrosekvenování a komparativní genomové sekvenace u *Treponema Pallidum* subsp. *Pertenue* samoa D

Zobaníková M., Strouhal M., Matějková P., Čejková D., Šmajš D.

Biologický ústav LF MU, Kamenice 5 - budova A6, 625 00 Brno-Bohunice, CZ

Kmen Samoa D (*Treponema pallidum* subsp. *pertenue*), původce onemocnění yaws, je na úrovni sekvence DNA příbuzný syfilitickému kmeni Nichols (*Treponema pallidum* subsp. *pallidum*). Metodou DNA fingerprinting byla zjištěna stejná struktura genomů i stejné pořadí genů obou poddruhů, microarray analýza otevřených čtecích rámců odhalila vysokou sekvenční příbuznost jednotlivých genů (> 99 %). Pro odhalení podstaty rozdílů v klinické manifestaci syfilis a yaws je tedy nezbytné určit kompletní nukleotidovou sekvenci *T. pallidum* subsp. *pertenue*. Sekvence genomu kmene Samoa D byla získána pomocí komparativní genomové sekvenace (CGS) a pyrosekvenování. CGS bylo získáno 8 kontigů s 8 mezerami o velikosti 15 - 3850 bp. Pyrosekvenováním bylo získáno 29 kontigů s 29 mezerami o velikosti 1 - 3344 bp. Porovnáním CGS a pyrosekvenování bylo odhaleno 512 odlišností, které byly ověřeny sekvenací podle Sanger. Na chybách způsobených pyrosekvenováním se podílí z 93,6 % delece a inserce (poměr delecí a insercí je stejný), z 6,4 % substituce, na chybách způsobených CGS se podílejí z 47,5 % substituce, z 35,7 % delece a z 13,3 % inserce a z 3,5 % kombinované změny. Z výsledků vyplývá, že CGS chybí 1,3x častěji než pyrosekvenování. Velký podíl na chybách u pyrosekvenování je dán limitací této metody při zpracování signálu z homopolymerních úseků. Chyby u CGS mohou být způsobeny nepřesností referenční sekvenace kmene Nichols. Podporováno granty GAČR č. 310/07/0321 a IGA MZ ČR č. NR/8967-4/2006.

Continuous assays for studying DNA translocation by EcoR124I Type I RM enzyme

Šišáková E. (1), Seidel R. (2), Szczelkun M. (3), Weiserová M. (1)

(1) Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083,142 20 Prague 4, Czech Republic; (2) Biotechnological Center, University of Technology Dresden, Tatzberg 47-51, 01307 Dresden, Germany; (3) DNA- Protein Interactions Unit, Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol, BS8 1TD, UK

The Type I restriction-modification enzyme EcoR124I is a multifunctional, hetero-oligomeric enzyme complex that cleaves DNA after extensive ATP hydrolysis coupled to processive DNA translocation. ATP hydrolysis and DNA translocation are conferred by superfamily 2 helicase motifs in the central domain of its HsdR subunit. The N-terminal domain carries a conserved region with catalytic residues reminiscent of the PD-(D/E)-X-K catalytic motif of Type II restriction enzymes. Single amino acid substitutions in this motif completely abolish DNA cleavage activity of enzyme complex without affecting assembly of the complex. In our study we investigated how several mutations in this motif influence DNA translocation properties of the enzyme using combination of bulk solution and single-molecule assays. Translocation assays revealed that some mutations reduced the observed translocation rate compared to wt. The results from the single molecule assays also revealed that several mutants had two different populations with different translocation rates which remained hidden in bulk experiments. ATPase activity of the mutants was determined in steady-state stopped flow measurements using the phosphate-binding protein. Most mutant enzymes exhibited a significantly reduced ATPase activity compared to wt. This study may give us insight into the possible interdomain interactions between helicase and nuclease domains of the HsdR subunit and the effect of their interactions on DNA translocation.

Analysis of the fur genes in Fur mutants overproducing pyoverdinin

Palyzová A., Valešová R., Marešová H.

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i, Vídeňská 1083, Praha 4, 142 20

The expression of components of the pyoverdinin-mediated, iron uptake system in *Pseudomonas aeruginosa*, is controlled by a mechanism in which the regulatory Fur protein plays a key role. Modification of this protein should exhibit a pleiotrophic effect on the synthesis of component of the high-affinity iron transport system. The main interest of the project is focused on a study of the correlation between the overproduction of pyoverdinin and its specific outer membrane receptor FpvA in Fur mutants FPA12 and FF13 of the strains *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and PAO-Fe10, respectively. The fur genes from mutants were sequenced and changes in the sequences of amino acids in protein-conserved regions of the protein were found: a single amino acid replacement in FF13 occurred in the region of protein involved in a DNA recognition, while that in FPA12 was identified in a Fe-binding site. These mutations affected the regulatory role of the Fur protein and the mutants produced an elevated amount of pyoverdinin.

Genetic analysis of the nitrile hydratase producer *Rhodococcus Erythropolis* A4

Volkova O., Váňová P., Knoppová M., Elišáková V., Nešvera J., Pátek M.

*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i,
Videňská 1083, CZ-142 20 Praha 4, Czech Republic*

Using sequence analysis of 16S rDNA, the nitrile hydratase producing strain *Rhodococcus equi* A4 was reclassified as *R. erythropolis*. The procedure of transformation of this strain by plasmid DNA was developed. The plasmids pSRK21 (cloning vector), pSRK51 (expressing the green fluorescent protein gene) and pEPR1 (promoter probe vector with *gfp* as a reporter) based on the pCG1 replicon from *Corynebacterium glutamicum* were shown to replicate in the strain. Integration of the *E. coli* vector pKSAC45 with a fragment of *R. erythropolis* A4 chromosome by homologous recombination, as a basis for gene replacement technique, was proved. To characterize the genetic background of nitrile hydratase production, a fragment of the *R. erythropolis* A4 chromosome carrying a part of the *nha1* gene was amplified by using PCR and degenerated oligonucleotide primers and cloned in pKSAC45. Using the construct, the regions flanking the *nha1* fragment within the chromosome were obtained by chromosomal integration and plasmid-rescue technique. The DNA sequences of the regions adjacent to the original *nha1* fragment were determined. The resulting sequence revealed that the 8-kb gene cluster including the genes *oxd* (aldoxime dehydratase), *ami* (amidase), *nha1-nha2* (alfa- and beta-subunits of nitrile hydratase) and genes for transcriptional regulators is present on the *R. erythropolis* A4 chromosome. The transcriptional analysis and the experiments directed to overexpression of the enzyme-coding genes proceed.

Uspořádání 5' konců mRNA kódovaných lineárními plasmidy kvasinky *Kluyveromyces lactis*

Vopálenský V., Pospíšek M.

Katedra genetiky a mikrobiologie University Karlovy, Viničná 5, Praha 2, 128 44

Lineární dsDNA plasmidy kvasinky *Kluyveromyces lactis*, pGKL1 a pGKL2, jsou pozoruhodné cytoplasmatickou lokalizací a uspořádáním genomu, čímž připomínají DNA genomy cytoplasmatických virů čeledí Poxviridae či Asfarviridae. Jejich přítomnost v buňce je spojena s produkcí toxinu inhibujícího růst citlivých kvasinkových buněk. Zatímco povědomost o syntéze a mechanismu účinku toxinu je vcelku rozsáhlá, není mnoho známo o transkripci a translaci plasmidy kódovaných genů. Pomocí počítačových analýz a pilotních experimentů bylo zjištěno, že si tyto plasmidy samy kódují součásti svého transkripčního aparátu, čímž připomínají DNA genomy výše uvedených virových čeledí. V této práci jsme se zabývali právě charakterizací proteinu kódovaného otevřeným čtecím rámcem 3 plasmidu pGKL2. O tomto proteinu se soudí, že je schopen připojit N7-metylguanosinovou čepičku na 5' konce plasmidových mRNA, že je to tzv. capping enzym. Tento protein byl nadprodukován v bakteriálním a bakulovirovém expresním systému, vypurifikován pomocí afinitní chromatografie a částečně charakterizován pomocí molekulárně biologických a biochemických metod. Dále byly charakterizovány 5' konce plasmidových mRNA, právě s ohledem na přítomnost či nepřítomnost čepičky a s ohledem na „plasmid“ specifickou iniciaci translace.

Projekt Orlice: využití hub při studiu znečištění životního prostředí těžkými kovy v masivu Kralického sněžníku

Dvořák J., Merhautová V., Vrána J., Nerud F., Gabriel J.

Mikrobiologický ústav AVČR, Václavská 1083, 142 20 Praha 4-Krč

Projekt Orlice je zaměřen na komplexní výzkum historie, současnosti a budoucnosti česko-polského pohraničí v oblasti Orlickoústecka a Klodzka. Kromě regionálních sdružení se na něm podílí i několik ústavů Akademie věd ČR. V rámci práce na projektu byly v uvedených lokalitách sbírány plodnice šesti druhů dřevokazných hub (Fomes fomentarius, Fomitopsis pinicola, Ganoderma applanatum, Stereum hirsutum, Polyporus squamosus, Trichaptum fuscoviolaceum), ve kterých byly měřeny obsahy mědi, kadmia, manganu, olova a zinku. Celkem bylo zpracováno 55 vzorků plodnic, které byly po mikrovlnné digesci podrobeny analýze atomovou absorpční spektrometrií. Hodnoty kovů v plodnicích hub se pohybují v rozmezích, dříve zjišťovaných pro mírně industrializované oblasti. Na polské straně Sněžníku byly zjištěny vyšší hodnoty kadmia než v Čechách. Důvodem je patrně větší podíl lokálních topenišť, spalujících méně kvalitní uhlí či komunální odpad, roli může hrát i dálkový transport ovzduším. Zjištěné hodnoty odpovídají zhruba datům, naměřeným v plodnicích stejných druhů dřevokazných hub v Jeseníkách v roce 1995, významnější nárůst obsahů kovů ve vzorcích hub sbíraných v roce 2006 byl pozorován pouze u kadmia.

Metabonomics of clinically important filamentous fungi

Havlicek V. (1), Sklenar J. (1), Zabka M. (1), Nedved J. (1), Hajduch M. (2), Lemr K. (3), Moos J. (4)

(1) Institute of Microbiology, Prague; (2) Palacky University, Olomouc; (3) Palacky University, Olomouc; (4) Immunotech, Praha

Some cyclic peptides and depsipeptides are synthesized in microorganisms by large multienzymes called non-ribosomal peptide synthetases. The structures of peptide products originating in this way are complex and diverse and are microorganism-specific. This work proposes the use of fungal cyclic peptides and depsipeptides as extremely specific markers of fungal infections. Since a reliable molecular tool for diagnosing fungal infections at early-stage is still missing, we present mass spectrometry as a new, modern, broad-band (with respect to fungal strain) and specific tool for clinical mycologists. More than 40 different fungal species can be rapidly characterized according to specific families of cyclic peptides and in some cases, particular fungal strain can be identified based on its cyclopeptide profile. This work is also aimed at initiating the discussion on the biological role of these secondary metabolites, especially of those synthesized by medically important strains. Proven cytotoxic, anti-inflammatory or immunosuppressive activities of some cyclic peptides indicate that these molecules may contribute to the synergistic array of fungal virulence factors and support microbial invasion during fungal infection. In addition to an overview on recent mass spectrometric sequencing protocols for cyclic peptide sequencing, the structures of new peptides from *Paecilomyces* and *Pseudallescheria* will be presented. Acknowledgement: MSMT (LC7017)

Mikroskopické vláknité huby na stavebných materiáloch

Kolláriková, Z., Piecková, E.

Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 83303 Bratislava, Slovensko

V modelových pokusoch sa hodnotili antifungálne vlastnosti stavebných materiálov podľa ISO 846: 1997 E. Mikroskopické vláknité huby *Acremonium* sp., *Aspergillus ustus*, *A. versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium* sp. a *Scedosporium apiospermum* sa inkubovali na povrchu stavebných materiálov a stavebných materiálov s vrstvou domáceho prachu v sústavách so známou aktivitou vody (av; upravené NaCl podľa STN 56 0030) 0,94, 0,83 a 0,75 pri laboratórnej teplote 3 mesiace. Rast mikroorganizmov sa vyhodnocoval vizuálne v mesačných intervaloch. Po skončení pokusu sa hodnotila vitalita naočkovaných mikromycét odtlačkovou metódou. Všetky stavebné materiály s vápennou prímiesou, resp. olejovým náterom vykazali istý stupeň odolnosti voči kolonizácii mikroskopickými hubami, dokonca aj v podmienkach mimoriadnej vlhkosti (av 0,94). Zástupcovia bežnej vzdušnej mykoflóry – aspergily, penicíliá a *Cladosporium sphaerospermum* viditeľne rástli na testovaných vzorkách materiálov – čistých aj s prídavkom domáceho prachu (simulácia reálnej situácie znečistenia vo vnútorných priestoroch budov), hoci v rôznej intenzite v závislosti na zvolených vlhkosťných podmienkach. *Acremonium* sp. a *Scedosporium apiospermum* rástli podľa očakávania predovšetkým pri vysokej vlhkosti (av 0,94). Ani jeden testovaný stavebný materiál nevykazoval fungicídne vlastnosti a za najrezistentnejší možno na základe výsledkov považovať drevo.

Mikroskopické vláknité huby v obytných budovách na Slovensku

Piecková E., Kolláriková Z.

Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 83303 Bratislava, Slovensko

V troch klimatických oblastiach Slovenska sa počas teplejších (jar) a chladnejších (jeseň, zima) častí roka vykonala kvalitatívna a kvantitatívna analýza kultivovateľných mikroskopických húb vo vnútornom a vonkajšom ovzduší v súboroch bytov kontaminovaných hubami a kontrolných. Vo všetkých vyšetrovaných bytoch (celkom 60) boli objektivizované teplotno-vlhkostné parametre vnútorného prostredia, ako aj režim ich užívania obyvateľmi. Vo vonkajšom ovzduší celoročne dominovali *Penicillium chrysogenum* a *Aspergillus versicolor*, spolu s kladospóriami a alternáriami. Vzdušná mykoflóra kontrolných bytov reflektovala vonkajšiu. Z tzv. plesnivých bytov sa v oveľa väčšej miere izolovali kladospóriá, alternárie, penicíliá, aspergily a euróciá, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus* sp. a kvasinky. Najčastejšie boli hubami postihnuté obývačky a spálne. Vnútorné zdroje vlhkosti a dlhotrvajúce ochladzovanie vnútorného ovzdušia (nesprávne vetranie) sa javia ako najpotentnejšie faktory favorizujúce mikroskopických húb vo vnútorných priestoroch, čo v konečnom dôsledku vedie až tzv. plesnivému prostrediu – viditeľnému rastu mikromycét na povrchoch. Mikroskopické huby vo vnútornom prostredí (toxické, alergénne) predstavujú hygienický nedostatok, ktorý môže vážne ohroziť zdravie obyvateľov, predovšetkým detí.

Testování účinnosti antifungálních prostředků na vegetativní formy saprofytických vláknitých mikromycet

Růžička F. (1), Fogaš I. (2), Holá V. (1)

(1) *Mikrobiologický ústav LF a FN u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91, Brno;*

(2) *Moravská galerie v Brně, Husova 18, 662 26, Brno*

Běžné saprofytické mikromycety mohou napadat archiválie i obrazy a způsobit jejich k jejich narušení a poškození. Zároveň tyto houby patří mezi významné alergeny. Přítomnost jejich spor a částí v ovzduší může alergizovat pracovníky, kteří s takto napadeným materiálem přicházejí do styku a vyvolat celou řadu zdravotních problémů. Z napadených historických obrazů byly odebrány vzorky materiálu na mykologické vyšetření. Materiál na vyšetření byl odebírán z rubu i líce obrazů, z míst s makroskopicky zjevným napadením. Vzorky byly poté kultivovány při 27 °C na Sabouraudově agaru a následně identifikovány. Nejčastěji izolovanými agens byly mikromycety rodu *Penicillium* (*P. chryseogenum*, *P. brevicompactum*). Dále byly izolovány: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* a *Cladosporium cladosporoides*. Účinnost přípravku Germacert Plus (ředěný v poměru 1:50), který byl použit k ošetření obrazů, byla testována na 4denní kultuře *P. chryseogenum*, *A. niger* a *A. alternata*. Baktericidní účinnost jednotlivých koncentrací jsme prokazovali pomocí kolorimetrického média obsahující redoxní indikátor resazurin. Metabolická aktivita vitálních mykotických elementů, které přežily působení přípravku Germacert Plus, vedla ke změně barvy média. Pomocí této metody jsme prokázali účinnost přípravku Germacert Plus na testované kmeny až do ředění 1: 200. Koncentrace přípravku použitá k ošetření obrazů (ředění 1:50) se tak ukázala jako dostatečně účinná na všechny testované kmeny. Podpořeno SVC 1M0528.

Současná diagnostika farmářské plíce

Tomšíková A.

Mikrobiologický ústav LF UK Dr. E. Beneše 13 305 99 Plzeň

Farmářská plíce je v podstatě alergická alveolitis. Původcem je *Micropolyspora faeni*. Stejný klinický obraz ale vyvolává rod *Aspergillus*, rod *Penicillium* nebo tzv. senový antigen, který uniká z plesnivého sena nebo obilí (Syndrom podobný farmářské plíci). Diagnostika obou forem spočívá na průkazu specifických protilátek a na průkazu alergie.

Význam a obsahy některých dvojmocných kovů v plodnicích dřevokazných hub

Větrovský T., Merhautová V., Dvořák J., Vrána J., Baldrian P., Gabriel J.

Mikrobiologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4-Krč

Dřevokazné houby využívají jako zdroj živin dřevní hmotu. Rozklad celulosy či ligninu je komplexní proces, při kterém důležitou roli v enzymových či neenzymových (Fentonovských) procesech hrají dvojmocné kationty (např. Mn, Fe, Cu). Cílem této studie bylo zjistit reálné obsahy kovů v plodnicích dřevokazných hub. Vzhledem k možnému vlivu okolí byly zjišťovány obsahy kovů v houbách sbíraných na území tzv. čistých a znečištěných oblastí. Vzorky hub byly sbírány na území Krkonošského národního parku, Národního parku Šumava a na území hlavního města Prahy. Studie byla opakována po deseti letech (1996-2006). Příspěvek dokumentuje obsahy manganu, železa, mědi, kadmia, olova a zinku v plodnicích *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *Stereum hirsutum* a v dalších houbách. Celkově došlo ke zvýšení obsahů zinku, což podle naší hypotézy dokumentuje zlepšující se stav znečištění životního prostředí těžkými kovy.

Produkcia bioaktívnych metabolitov endofytickej huby *Fusarium* sp.

Cibíková P. (1), Firáková S. (1), Šturdíková M. (1), Bezáková Lýdia (2)

(1) Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie (FCHPT), Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovenská republika (2) Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika

V dnešnej dobe sa iba malá pozornosť venuje rastlinám čelade Magnoliaceae ako zdroju endofytov s potenciálnou schopnosťou produkovať bioaktívne látky ako sú fytochemikálie týchto rastlín, hoci fytochemikálie rastlín čelade Magnoliaceae vykazujú nielen antimikrobiálnu, protirakovinovú a kardioprotektívnu aktivitu, ale majú pozitívne psychoterapeutické a iné biologické účinky. Výskumná aktivita je orientovaná na využitie biotechnologických procesov pre produkciu bioaktívnych prírodných látok endofytickými mikroorganizmami. Podrobnejšie bol študovaný jeden izolát endofytickej huby z magnólie. Po získaní izolátu nasledovala charakterizácia a regulácia produkcie bioaktívnych metabolitov z *Fusarium* sp. Odkúšané boli viaceré stratégie na zvyšovanie výťažkov pre produkciu antimikrobiálnych a cytotoxických metabolitov endofytu. Manipulovanie hladiny živín prinieslo zvýšenie množstva produkovaných majoritných bioaktívnych metabolitov. Po čiastočnej separácii a identifikácii týchto produktov boli vybrané aminokyseliny odskúšané ako prekurzory na stimulovanie produkcie. Extrakty aj prečistené frakcie extraktov inhibovali aktivitu lipoxygenázy a vykazovali cytotoxickú aktivitu. Dosiiahnuté výsledky nasvedčujú tomu, že extrakty izolovaného kmeňa obsahujú skupinu látok s parametrami publikovanými pre fytochemikálie rastlín z čelade Magnoliaceae.

Autofluorescence houby bedly červenající *Macrolepida rhacodes*

Žižka Z., Gabriel J.

Mikrobiologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4-Krč

Autofluorescence hub je málo studovaným jevem. V této práci předkládáme první výsledky studia autofluorescence bedly červenající *Macrolepida rhacodes*. Primární fluorescenci houby jsme studovali fluorescenčním mikroskopem Zeiss Jenalumar při modré a zelené excitaci v dopadajícím světle s využitím apochromatických objektivů. V modrém světle vykazovaly hyfy slabou žlutozelenou až zelenou autofluorescenci, bazidiospory silnější žlutou autofluorescenci a granulární útvary v pokožce klobouku velmi intenzivní žlutou až žlutozelenou autofluorescenci. Při zelené excitaci jsme zaznamenali poměrně slabou červenou autofluorescenci s výjimkou bazidiospor, v jejichž povrchové vrstvě byla tak silná, že jsme ji mohli pozorovat i při vysokém zvětšení. Porovnáme-li autofluorescenci *M. rhacodes* s primární fluorescencí dřevokazné houby *Fomes fomentarius* (Žižka a Gabriel: *Folia Microbiol.* 51: 109-113, 2006), můžeme říci, že spektrální rozsah i intenzita fluorescence různých částí plodnice *F. fomentarius* je mnohem větší, což je asi způsobeno intenzivní primární fluorescencí zbytků dřevní hmoty a zejména setů. Staré hyfy této houby také neměly silnou autofluorescenci při modré excitaci, i když při zelené excitaci jejich autofluorescence byla srovnatelná s generativními hyfami. Autofluorescence *M. rhacodes* je podstatně slabší než primární fluorescence dřevokazných hub, jako je např. *F. fomentarius*, *Daedalea quercina*, *Piptoporus betulinus*, *Fomitopsis pinicola* a další.

The inhibitory effect of *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus paracasei* SF1 in infant milk- and cereal-based formula

Chumchalová J. (1), Giesová M. (1), Plocková M. (1), Rodary A. (2), Bullerman L.B. (3)

(1) Institute of Chemical Technology, Prague, Department of Dairy and Fat Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic; (2) Ecole des Mines D'Albi, Carmaux, Campus Jarlard – Route de Teillet, 810 13 Albi CT Cedex 09, France; (3) University of Nebraska, Lincoln, Department of Food Science and Technology, Nebraska 68583-0919 USA

The effect of *Lactobacillus* (L.) *rhamnosus* VT1, L. *paracasei* SF1 and their mixed culture against *Fusarium proliferatum* M5689 in an infant formula containing a milk and cereal base was evaluated during simultaneous cultivation of the mould and the bacterial strain and in a porridge preincubated with lactobacilli. The highest amount of moulds in the samples inoculated with the mould and lactobacilli and their mixed culture and incubated at 25°C was detected after 8 (L. *rhamnosus* VT1) and 6 (L. *paracasei* SF1 and the mixed culture) days of incubation and reached 106 and 105 CFU.g⁻¹, respectively. During simultaneous cultivation at 15°C the total mould count detected in the presence of L. *paracasei* SF1 and the mixed culture increased by 3.5 log cycles during first week of incubation, the highest mould count (106 CFU.g⁻¹) was detected after 13 days of incubation. In samples inoculated only with the mould strain an increase in the mould count by 6 log cycles within the first week of cultivation was detected at both temperatures. In the porridge preincubated with lactobacilli and inoculated with the mould, total inhibition of the mould growth was observed. Total mould count in the preincubated porridge without lactobacilli present and stored at 25°C exceeded 106 CFU.g⁻¹ within 5 days of incubation. The mould growth curve in the preincubated porridge stored at 15°C followed similar pattern to the one determined in the non-preincubated samples.

Výběr potenciálních probiotik na základě fyziologických charakteristik in vitro

Kováříková E., Erban V.

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Radiová 7, 102 31, Praha 10

Bakterie mléčného kvašení (LAB – lactic acid bacteria) jsou považovány perspektivní zdroj probiotik. In vitro lze testovat probiotické vlastnosti jako je odolnost vůči nízkému pH, rezistence vůči žlučovým kyselinám (ZK) a rezistence vůči teplotám 39-40°C. Testovali jsme soubor sbírkových kmenů bakterií mléčného kvašení. Výsledky prokázaly, že téměř všechny kmeny jsou odolné vůči kyselému šoku, který simuloval průchod žaludkem. V rezistenci vůči ZK se kmeny výrazně liší. Mezi testovanými kmeny *Lactobacillus acidophilus* jsou kmeny výrazně citlivé, ale i kmeny relativně odolné. Testované kmeny *Bifidobacterium bifidum* se jevíly rezistentní a oba testované kmeny *Enterococcus faecium* byly shledány rezistentní vůči inhibičnímu působení žlučových kyselin. Výsledky získané z růstových pokusů, byly potvrzeny pomocí fluorescenčního sledování živých a mrtvých buněk v mikroskopu. Buňky citlivého kmene odumíraly již po 5 minutovém působení ZK. Rezistentní populace (*Enterococcus faecium*) také prokázala pokles počtu živých buněk po vystavení vlivu ZK, ale část buněk zůstala živá (s neporušenou membránou) i po 15-ti minutách expozice. Zmíněné kmeny mají optimální teplotu růstu 37°C. Stejným systémem jsme testovali směsnou kulturu smetanového zákysu, která má teplotní optimum 30°C. Při této teplotě, se kultura byla dostatečně odolná vůči inhibici ZK, ale při teplotě 39°C se rezistence významně snižuje. Projekt je podporován MZE 0002702201 a NAZV GF3284.

Aktuálne trendy v rýchlej identifikácii patogénnych baktérií v potravinách použitím polymerázovej reťazovej reakcie

Kuchta T.

Oddelenie mikrobiológie a molekulárnej biológie, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, Bratislava

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je molekulárno-biologická metóda, ktorá, v kombinácii s kultivačným rozmnožením a uvoľnením DNA z bakteriálnych buniek, umožňuje urýchlenie identifikácie patogénnych baktérií v potravinách s potrebnou citlivosťou i selektivitou. V súčasnosti sú na tomto princípe k dispozícii metódy na dôkaz salmonel, *Listeria monocytogenes*, toxínogénnych *E. coli*, termofilných *Campylobacter spp.*, *Bacillus cereus*, termorezistentných *Enterobacter sakazakii*, *Clostridium perfringens* a i. Všetky metódy využívajú kultivačné rozmnoženie, ktoré môže byť jednostupňové alebo dvojestupňové. Dvojestupňové rozmnoženie sa odporúča v prípade potravinových vzoriek s vysokým obsahom mŕtvych bakteriálnych buniek. DNA sa z rozmnožených kultúr získava lýzou varom, pričom v prípade jednostupňového rozmnoženia sa odporúča lyzát prečistiť. Na vlastnú detekciu sa presadzuje použitie PCR s priebežným monitorovaním fluorescence (real-time PCR), pričom túto je potrebné realizovať v usporiadaní duplex, s použitím internej amplifikačnej kontroly. Osvedčuje sa použitie 5' nukleázovej real-time PCR so sondami typu TaqMan. Špecifická sekvencia DNA cieľovej baktérie sa deteguje s použitím sondy označenej farbivom FAM, interná kontrola sa deteguje s použitím sondy označenej farbivom VIC, JOE a pod. Ďalšie rozšírenie využitia metód založených na real-time PCR na analýzu potravín je možné očakávať vďaka zníženiu cien prístrojov i biochemikálií, a tiež na základe vypracovania príslušných noriem.

Vývoj DNA čipů pro detekci patogenů přenášených potravinami

Landová M., Pazlarová J., Demnerová K.

VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, Praha 6, 16628

Cílem práce bylo navrhnout a připravit oligonukleotidový DNA čip pro detekci významných původců alimentárních onemocnění, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. a *Listeria monocytogenes*. Jako vhodné cílové geny pro detekci sledovaných patogenů byly zvoleny geny *rrs* pro 16S rRNA a *rrl* pro 23S rRNA. Pro zjednodušení amplifikačního kroku, byla navržena duplex PCR umožňující amplifikaci úseků obou genů v jedné reakci. Byly nalezeny vhodné podmínky reakce při kterých vznikaly pro všechny tři bakterie oba produkty duplex PCR o přibližné velikosti 370 bp a 900 bp. DNA čip byl připraven imobilizací sond specifických pro jednotlivé patogeny na skleněný nosič s aldehydovou modifikací povrchu. Při hledání vhodných podmínek hybridizace byla ověřena možnost použití produktů duplex PCR bez předchozího přečištění. Nejlepších výsledků bylo dosaženo hybridizací jednořetězcových PCR produktů. S připraveným DNA čipem byly hybridizovány vzorky *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* a *Listeria monocytogenes*. Pro všechny tyto patogeny byly získány typické hybridizační stopy, podle kterých je bylo možno od sebe rozlišit. Pro deset testovaných serotypů salmonel (sérotypy Albany, Emek, Enteritidis, Hadar, Infantis, Kentucky, Newport, Saintpaul, Typhimurium a Wirchow) vznikaly při duplex PCR dva PCR produkty očekávané velikosti. Pro čtyři vybrané serotypy (Enteritidis, Typhimurium, Infantis a Newport) vznikaly při hybridizaci stopy typické pro rod *Salmonella*.

Vplyv zinku na interakcie probiotických laktobacilov a patogénov

Mudroňová D. (1), Nemcová R. (1), Gancarčíková S. (1), Lauková A. (2), Štyriak I. (2), Györyová K. (3), Bomba A. (4)

(1) Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; (2) Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Šoltésova 3-4, 041 01 Košice, SR; (3) Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Mojzesova 11, 040 01 Košice, SR; (4) Lekárska fakulta, UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 66 Košice, SR

Podľa doterajších výskumov sa zdá, že zinok je esenciálny pre všetky živé systémy, vrátane mikroorganizmov. Zinok je súčasťou mnohých mikrobiálnych enzýmov nevyhnutných pre bunkový metabolizmus. Na druhej strane sú však známe antimikrobiálne vlastnosti zinku. Citlivosť baktérií voči zinku v prostredí je nielen druhovo, ale aj kmeňovo závislá. Z nami testovaných 22 kmeňov laktobacilov boli 2 probiotické kmene – *L. fermentum* a *L. plantarum* schopné rásť vo vysokých počtoch – 10⁸ cfu/ml pri koncentrácii 5g Zn²⁺/l média. Kým nízke koncentrácie <100 mg Zn²⁺/l rastového média neovplyvňovali rast a probiotické vlastnosti týchto dvoch kmeňov, koncentrácie 100 – 500 mg Zn²⁺/l mali stimulačný vplyv na celkové počty, produkciu organických kyselín, adhérenciu na prasačie enterocyty a inhibíciu patogénov. Naopak vysoké koncentrácie >500 mg Zn²⁺/l tieto vlastnosti inhibovali. Prežiteľnosť laktobacilov v podmienkach tráviaceho traktu ani citlivosť na antibiotiká nebola zinkom ovplyvnená. Testované gramnegatívne patogénne baktérie – salmonely a *E. coli* boli výrazne citlivejšie na pôsobenie pôsobenie všetkých testovaných zinočnatých zlúčenín v porovnaní s grampozitívnymi baktériami (*Staph. aureus*), pričom najrezistentnejšie boli laktobacily. Pozitívny vplyv zinku na probiotické vlastnosti laktobacilov boli potvrdené aj v in vivo experimentoch na myšiach, prepeliach a prasatách. Táto práca bola podporovaná APVV na základe zmluvy č. APVV-20-062505 a VEGA 1/2474/05.

Testování antimikrobiální aktivity bifidobakterií

Tománková E., Šmečilová M., Boušková J., Rada V.

*Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky,
Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka*

Probiotické kmeny bifidobakterií jsou vybírány na základě řada kritérií, mezi něž patří i antimikrobiální působení na patogenní nebo potenciálně patogenní bakterie. Proto bylo cílem naší práce izolovat a identifikovat bifidobakterie z faeces telat, jehňat a kojenců a testovat jejich antimikrobiální vlastnosti. Dalším cílem bylo studium mechanismu antagonistického působení bifidobakterií proti kmenům *E.coli* a klostridií. Kmeny bakterií byly izolovány pomocí selektivních agarů a identifikovány na úroveň druhu. Antagonistické působení bifidobakterií na *E. coli* a klostridie bylo sledováno deskovou difúzní metodou na Mueller-Hinton agaru, respektive na Wilkins-Chalgren agaru. Byl sledován mechanismus inhibičního účinku bifidobakterií. Z našich výsledků vyplývá, že bifidobakterie potlačovaly růst *E. coli* a klostridie zejména působením organických kyselin, které jsou hlavním produktem jejich metabolismu. Ale ani inhibiční působení antimikrobiálních látek na bázi polypeptidů nelze zcela vyloučit. Práce byla sponzorována granty GAČR 523/05/P117, GAČR 523/03/H076 a MSM 6046070901.

Antiklostridiální aktivita *Lb. paracasei* vyskytujících se v polotvrdých sýrech

Tůma Š., Plocková M., Kučerová K., Chumchalová J.

VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6, 166 28

Tato práce byla zaměřena na sledování antiklostridiální aktivity vybraných kmenů laktobacilů izolovaných z polotvrdých sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. Ze souboru laktobacilových kmenů byly na základě screeningového vyšetření proti 16 kmenům rodu *Clostridium*, vybrány kmeny *Lb. paracasei* 171R2 a *Lb. paracasei* ST68 s antiklostridiální aktivitou proti sedmi a čtyřem indikátorovým kmenům. Antimikrobiální účinek u *Lb. paracasei* 171R2 byl způsoben látkou bílkovinné povahy, tedy bakteriocinem. Kmen *Lb. paracasei* ST68 neprodukoval bakteriocin, tedy inhibice byla způsobena jinými metabolity. U obou kmenů bylo stanoveno množství H_2O_2 produkované laktobacily pomocí peroxidasy a o-dianisidinu. Kmen *Lb. paracasei* 171R2 produkoval $0,58 \mu g H_2O_2$ na litr fosfátového pufru a *Lb. paracasei* ST68 $0,42 \mu g H_2O_2$ na litr fosfátového pufru. Kmeny *Lb. paracasei* ST68 a *Lb. paracasei* 171R2 snižovaly při společné kultivaci s klostridii jejich celkové počty v RCM o 2-3 řády, v mléce o 1 až dva řády avšak nikdy nedošlo k úplnému potlačení. Při kultivaci kmenů *Cl. butyricum*, *Lb. paracasei* ST68 a *Lb. paracasei* 171R2 v případě cheese slurry (modelovém systému sýra) došlo k potlačení klostridií během sledované doby společné kultivace o 2 řády. V této práci bylo potvrzeno, že laktobacily přirozeně se vyskytující v sýrech disponují antimikrobiálními vlastnostmi, ale mají schopnost pouze částečně potlačit růst klostridií.

Inhibitory potential of lactic acid bacteria: quantitative analysis of the interaction with food undesirable organisms

Valík L., Medved'ová A., Liptáková D.

*Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave Radlinského 9
812 37 Bratislava Slovenská republika*

The effect of two mesophilic lactic acid bacteria (LAB) on growth of *S. aureus* was studied at the temperatures ranged from 10 to 37 °C in co-culture. The squared root model of Ratkowsky was used in order to demonstrate the intensity of *S. aureus* rate decrease caused by several densities of LAB inoculums, followed by their growth and lactic acid production. The mutual comparisons of *S. aureus* dynamics in co-culture with LAB and alone in milk were applied to the conditions of ewe's lump cheese production at farm level. Based on the results found within this study, we recommend LAB addition prior to fermentation of raw milk so that the activity of lactic acid bacteria naturally present in milk was supported and thus the risk of intoxication by *S. aureus* minimalized. Naturally, this should be accompanied also with any action in good hygiene practice preventing raw ewe's milk from *S. aureus* contamination.

Vliv přídatku nisinu na lyzi laktokoků v citrátovém pufru

Abrlová M., Hlavsová B., Šviráková E., Plocková M.

VŠCHT v Praze, Technická 5, 16628 Praha 6

Buněčná lyze je děj, při kterém dochází k degradaci buněčné stěny a k následnému pronikání intracelulárních enzymů do okolí buňky. U buněk dochází k lyzi samovolně. Lyze buněk může být ale ovlivněna dalšími faktory, např. množstvím živin, pH, teplotou a přítomností různých látek. Jednou z látek ovlivňujících buněčnou lyzi je i bakteriocin nisin. Nisin přímo narušuje buněčnou stěnu grampozitivních bakterií a aktivuje lyziny přítomné v buňkách. V práci byl zjišťován vliv přídatku nisinu (Nisaplin®) na lyzi kmenů *Lactococcus lactis* (NIZO R5, HMM 81, NIZO B643 a AM 2) kultivovaných v citrátovém pufru (pH 5) při teplotě 13 °C po dobu 12 dnů. U všech testovaných kmenů docházelo v citrátovém pufru (bez přídatku nisinu) k lyzi všech kmenů; nejvyšší lyze 44 % byla zjištěna u kmene HMM 81 (vysoce lytický kmen), naopak nejnižší lyze 26 % byla zjištěna u kmene NIZO B643 (středně lytický kmen). Přídatvek nisinu (0 - 5000 IU nisinu.ml-1) k citrátovému pufru obecně zvyšoval lyzi všech laktokokových kmenů oproti systému bez přídatku nisinu. Nejvýraznější vliv přídatku nisinu na lyzi byl pozorován u kmene B 643, naopak nejnižší vliv přídatku nisinu na lyzi byl pozorován u kmene AM 2. Testované laktokoky byly k nisinu různě citlivé.

Bioinženýrské aspekty růstu směsné termofilní kultury na laktose

Babák L., Vítová E.

Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická VUT v Brně, Purkyňova 118, 61200 Brno

Práce je příspěvkem k řešení možností biodegradace odpadních organických látek pomocí směsné termofilní aerobní bakteriální kultury (kal ČOV Bystřice pod Hostýnem). V první fázi je odpadní médium simulováno optimalizovaným syntetickým laktosovým substrátem a v druhé fázi je aplikováno skutečné odpadní syrovátkové médium z mlékárenského průmyslu (Pribina Přibyslav) po vysrážení bílkovin. K vlastním kultivacím byl zvolen bioreaktorový systém BIOSTAT B (B. Braun Biotech) vybavený násobným turbínovým míchadlem a účinným aerátorem. Testovány byly různé fyzikálně-chemické vlivy (teplota, pH, velikost aerace, aj.) na růstové profily kultury a eliminaci organických látek vyjádřených sumárně jako CHSK. Součástí práce bylo i stanovení vybraných bioinženýrských parametrů jako měrné růstové rychlosti, produktivity biomasy, či objemového součinitele přestupu kyslíku. Bylo zjištěno, že pokles CHSK po 48 hodinách vsádkové kultivace činil ve fermentoru se syntetickým médiem (72 ± 4 %), zatímco u průmyslového média byl pokles přibližně poloviční, tj. (34 ± 3 %). Růst kultury korespondoval s biodegradační aktivitou, tedy většího množství biomasy bylo dosaženo na syntetickém médiu. Optimalizačním procesem pak byla docílena ideální teplota vzhledem k eliminaci CHSK: $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ při pH 6.5.

Screening of enterococcal isolates from Bryndza for antimicrobial activity against selected lactic acid bacteria

Belicová A., Dušínský R., Ebringer L.

Institute of Cell Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina, 84215 Bratislava, Slovakia

The 117 strains of *Enterococcus faecium* and 40 strains of *E. faecalis* isolated from Bryndza were screened for their antimicrobial activity against lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains CCM 4288, 4290, 4755; *L. delbrueckii* subsp. *lactis* strains CCM 2344, 2772; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; *L. brevis*; *L. rhamnosus*; *L. paracasei* subsp. *paracasei*; *L. helveticus* strains CCM 3806, 4289; *L. sakei* subsp. *carneus*; *L. plantarum* and *L. acidophilus*). Experiments were performed in vitro by the agar well diffusion method based on the observation of growth inhibition of indicator strains in Petri dishes. The cell-free supernatants of enterococcal isolates from cultivation in MRS showed higher antimicrobial activity against indicator bacteria than supernatants from cultivation in reconstituted milk. The most effective *E. faecium* supernatant inhibited nine indicator strains. The highest inhibitory activity from *E. faecalis* supernatants possessed LMII/11 strain which inhibited growth of all tested LAB. Susceptibility of LAB decreased in order *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 4288, *L. lactis* subsp. *lactis* and *S. thermophilus*. None of tested *E. faecium* and *E. faecalis* supernatants had effect on *L. brevis* and *L. rhamnosus*. Antagonistic effect of enterococci against others LAB was heterogeneous and strain specific. This work was supported by VEGA grant No. 1/2422/05.

Genotypová charakteristika *S. aureus*

Belušíková Z. (1), Pospíšilová M. (2), Karpíšková R. (2), Gutser K. (3), Wagner M. (3)

(1) *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*; (2) *Centrum hygieny potravinových řetězců Brno, Státní zdravotní ústav Praha*; (3) *Veterinärmedizinische Universität Wien*

S. aureus je saprofyt a komenzál kůže a sliznic zvířat i člověka. Jako patogen může způsobit celou řadu onemocnění, od drobných infekcí kůže až po fatální sepsi. V současnosti se řadí k nejvýznamnějším původcům alimentárních intoxikací. Přibližně 50 – 75 % kmenů je schopno ve vhodných podmínkách produkovat extracelulární toxiny (enterotoxiny, exfoliativní toxiny a TSST - 1). Stafylokokové enterotoxiny (SEs) a TSST-1 jsou velmi potentní bakteriální superantigeny podílející se na vzniku „Syndromu toxického šoku“ (STŠ). Cílem práce bylo metodou PCR zjistit prevalenci genů kódujících TSST-1 (tst) u izolátů *S. aureus* získaných ze syrového kravského mléka. Celkem bylo vyšetřeno 89 izolátů. 74 izolátů bylo získáno z různých farem v SRN, 15 izolátů pocházelo z ČR. U žádného z 15 izolátů z ČR nebyl detekován tst. U 74 izolátů získaných z SRN byla zjištěna přítomnost genu tst v 9 případech. Spektrum genů kódujících SEs bylo širší u izolátů z SRN (8 různých genotypů) v porovnání s izoláty z ČR (7 genotypů). Izolátů z SRN bylo ovšem vyšetřeno téměř pětkrát více. Rozšíření kmenů *S. aureus* schopných produkce TSST-1 a SEs může hrát důležitou roli v epidemiologii STŠ a stafylokokových intoxikací. Cesta přenosu a šíření těchto kmenů může být i prostřednictvím potravin a potravinových zvířat. Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Vliv vybraných fosfátových tavicích solí na růst bakterií druhu *Staphylococcus aureus* a rodu *Bacillus*

Buňková L., Nováková A., Buňka F.

Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G.Masaryka 275, 762 72 Zlín

Sodné soli fosfátů jsou tavicí soli používané v technologii výroby tavených sýrů. Jejich základní účinek spočívá ve schopnosti odštěpení vápenatých iontů z kaseinové matrice přírodních sýrů a jejich nahrazení ionty sodnými. Tavicí soli se dávkuje v množství 2-3 % w/w. Schopnost fosfátů vázat vápenaté ionty roste s jejich kondenzačním stupněm a s teplotou systému. Byly vybrány tři tavicí soli: 690 – směs orthofosfátů a difosfátů; S9 – směs polyfosfátů a orthofosfátů; HBS – směs polyfosfátů s vysokým kondenzačním stupněm (vyšší stupeň polymerace než S9) a orthofosfátů. Vybrané druhy tavicích solí byly přidány do média (Mueller-Hinton agar) v koncentracích 0,1-0,5 % (w/v). Na takto připravené půdy byly očkovány mikroorganismy: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*. Výsledky byly odečteny po 48h inkubaci při 30°C. Z vybraných tavicích solí působila nejvíce HBS, která účinkovala na všechny 3 kmeny bakterií při koncentraci 0,3% a vyšší. Při těchto koncentracích nebyl zaznamenán růst bakterií. U zbývajících dvou tavicích solí nebyly zaznamenány významné inhibiční účinky na růst *Staphylococcus* i *Bacillus*. Mírné antibakteriální účinky vykazovala sůl S9 při vyšších koncentracích na růst *S. aureus* a *B. cereus*, kde došlo ke snížení počtu bakterií, avšak ke striktní inhibici růstu nedošlo. Výsledky naznačují, že čím více obsahují tavicí soli polyfosfátů s vysokým kondenzačním stupněm, tím je větší antibakteriální účinek. Poděkování MŠMT: MSM 7088352101.

Antimikrobiální účinky vybraných monoacylglycerolů na mikroorganismy kontaminující potraviny

Buňková L., Mikulcová M., Černíková M., Krejčí J., Hrabě J.

Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, UTB ve Zlíně Nám. TG Masaryka 275 762 72 Zlín

Monoacylglyceroly (MAG) patří mezi nejužívanější potravinářské emulgátory. Využívají se také v průmyslu kosmetickém a farmaceutickém. Zajímavým objevem v jejich působení bylo prokázání antimikrobiálních účinků vůči některým mikroorganismům. Cílem práce bylo sledovat růst mikroorganismů na pečivo a na strojně odděleném mase (SOM) před a po aplikaci MAG C8:0, C10:0, C12:0, C16:0 a C18:0, popř. jejich kombinací. Na pečivo byly aplikovány 1% (w/w) MAG třemi způsoby: 1) před pečením, 2) po pečení a 3) před i po pečení. Poté byl sledován růst plísni přirozeně kontaminujících pečivo a plísni, které byly zaočkovány. Na SOM, skladované při různých teplotách, byly MAG aplikovány v koncentracích 0,1% a 0,25% (w/w). V daných časových intervalech byl vzorek SOM odebrán a byl proveden mikrobiologický rozbor. Účinky MAG na pečivo byly znatelné u všech aplikací. Nejúčinnějším způsobem aplikace MAG na pečivo byla aplikace potěrem MAG po pečení. Nejmenší inhibiční účinek v růstu byl zaznamenán u aplikace MAG před i po pečení, kdy růst plísni nebyl tak hojný jako u kontrolní série, avšak ke striktní inhibici růstu nedošlo. Z hlediska účinnosti MAG se zdá, že účinnější při aplikaci po pečení se jeví MAG C8:0 na všechny plísně, kterými bylo pečivo kontaminováno. Tuto aplikaci MAG lze proto doporučit pro odzkoušení v praxi. Na SOM nemají zvolené MAG výraznější inhibiční vliv na růst aerobních a fakultativně anaerobních bakterií, včetně *Escherichia coli*. Poděkování MŠMT: MSM 7088352101.

Studium bakteriocinů pro potlačení růstu *Listeria monocytogenes*

Řiháková J., Demnerová K.

VŠCHT Technická 5, Praha 6

Bakterie mléčného kvašení, představované rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* a *Streptococcus* jsou významné v potravinářském průmyslu nejen jako technologické kmeny (např. mléčné a masné výrobky), ale též jako producenti látek s antimikrobiálními vlastnostmi (např. bakteriociny). Bakteriociny jsou peptidy produkované během exponenciální fáze růstu bakterie. Potlačují růst mikrobiálních patogenních druhů taxonomicky blízkých k produkčnímu kmeni jako jsou *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* a *Listeria monocytogenes*. Přítomnost těchto peptidů může v potravinách přispívat k prodloužení doby trvanlivosti výrobku a snižovat riziko kontaminace výrobních prostor. V současné době se řada prací soustřeďuje na studium vztahu struktury a funkce jednotlivých bakteriocinů. Naším cílem je objasnit tento jev u divergenciu V 41, produkovaný bakterií *Carnobacterium divergens*. Sledujeme vliv změny v primární struktuře na aktivitu bakteriocinu proti *Listeria monocytogenes*.

**Antibacterial activity of lactic acid produced by probiotic bacteria
Enterococcus faecium M 74 and its ability to reduce cholesterol in MRS
medium**

Dobias J, Belicová A, Ebringer L.

*Prírodovedecká fakulta UK, Ústav bunkovej biológie, Mlynská dolina, 84215
Bratislava*

After 24 hour fermentation, the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* M 74 in MRS medium produced lactic acid in such amount which in cell free supernatant showed antibacterial activity against *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Edwardisia tarda*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*. The effective antibacterial substance in fermented medium was lactic acid in concentration 12,7 g.l⁻¹. The qualitative determination of lactic acid in medium was done by TLC on silicagel. Correlation between antimicrobial activity against all pathogenic microorganism and concentration of lactic acid was determined by agar diffusion plate method in the concentration interval 15 – 60 g.l⁻¹. After the valuation of experimental results by the statistical method of regression analysis, it was shown, that sensitivity of pathogens against lactic acid lowered in the order: *S. enterica*, *E. tarda*, *V. cholerae*, *S. aureus* and *E. coli*. The concentration of cholesterol in medium was 100 g.l⁻¹ and at the end of fermentation, the microorganism *E. faecium* M 74 reduced its amount about 35,1 %. It was proved, that one of the mechanisms reducing cholesterol in fermented medium was adsorption of cholesterol on surface live and dead cells of *E. faecium* M 74. Possibility of lowering the amount of cholesterol in human food by means of this probiotic bacteria was discussed. This work was supported by VEGA grant No. 1/2422/05.

Charakteristika mikroflóry povrchu chlazené drůbeže

Doležalová M. (1), Marounek M., (2), Březina P. (1), Sedláček I. (3), Šmajš D. (4)

(1) Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati, nám. TGM 275, 762 72 Zlín; (2) Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha; (3) Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Tvrděho 14, 602 00 Brno; (4) Biologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Kamenice 5 - budova A6, 625 00 Brno-Bohunice;

Kůže chlazené drůbeže má ideální podmínky pro růst širokého spektra mikroorganismů. Má dostatek živin, vody a vhodné pH okolo 6,5. Sledování složení mikroflóry a zejména detekce patogenních bakterií je jedním z aktuálních úkolů, které řeší současný výzkum potravinářské mikrobiologie. Počet hlášených alimentárních chorob způsobených infekcí *Salmonella* sp. či *Campylobacter* sp. v České republice za rok 2006 činil 47 815. Bylo získáno přes 200 bakteriálních izolátů z povrchu chlazených kuřat poskytnutých firmou Raciola Jehlička s.r.o. Uherský Brod. Na základě běžných mikrobiologických charakteristik (morfologie buněk, Gramovo barvení, oxidace/fermentace glukózy, produkce oxidázy, katalázy) byly bakteriální kmeny rozděleny do šesti hlavních skupin: G– nefermentující OXI+ tyčinky; G– nefermentující OXI– tyčinky; G– fermentující OXI+ tyčinky; G– fermentující OXI– tyčinky; G+ koky; G+ tyčinky. Při identifikaci do rodů byly nejčastěji nalezeni zástupci č. Enterobacteriaceae (*Escherichia* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp.), dále *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., a *Staphylococcus* sp. Izoláty identifikované jako *E. coli* byly otestovány na produkci kolicinů. Třináct produkčních kmenů bylo podrobeno PCR typizaci. Šest z nich produkovalo pouze jeden typ kolicinu, zbytek jich produkoval dva a více. Nejčastěji identifikovanými koliciny byly koliciny Y a E (E1, E2, E6), dále byly nalezeni producenti kolicinů Ia, B a M. Pět izolátů produkovalo mikrociny (V, M, L).

Genetic variability of *Enterobacter sakazakii* strains differing in thermal tolerance

Drahovská H. (1), Družbacká J. (1), Vlková B. (1), Krascenicsová K. (2), Kaclíková E. (2)

(1) Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina 1, 841 15, Bratislava, Slovak Republic (2) Food Research Institute, Priemysel'ná 4, Bratislava, Slovak Republic

Enterobacter sakazakii is an opportunistic pathogen associated with sporadic cases of severe infections in neonates causing meningitis, necrotizing enterocolitis and sepsis. This organism is widely distributed in environment and rehydrated infant formula is the most common source of infection. Considering infant formula is not a sterile product, thermotolerant strains of *E. sakazakii* represent increased risk to survive during infant formula reconstruction. In this study, *E. sakazakii* strains isolated from food were typed by the AFLP method. The tested set was supplemented with 11 collection strains which originated mainly from human infections. The great genetic variability between strains was observed, the mutual similarity of strains reach the value of 40-100%. At the 75% similarity level strains were separated into 10 AFLP groups. The genetic heterogeneity within the species was confirmed by partial sequencing of 16S rRNA gene in several strains, similarity of sequences was 96.4-98.7%. Some correlation between thermotolerance and separation into AFLP groups was observed. Thermotolerant *E. sakazakii* strains were arranged into 8 AFLP groups, hereby four AFLP groups contained exclusively thermotolerant strains.

Characterization of enterococci isolated from Bryndza cheese for antagonistic activity towards selected potentially pathogen bacteria

Dušinský R., Belicová A., Ebringer L.

*Institute of Cell Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovakia*

The purpose of this study was to characterize enterococci from Bryndza cheese for inhibition the growth of potentially pathogen bacteria. One hundred and fifty tree enterococcal isolates (113 of *E. faecium* and 40 of *E. faecalis*) were obtained from Bryndza cheese made from the raw sheep milk by a traditional method. The cell-free supernatants of these isolates were evaluated for inhibitory action against *Acinetobacter calcoaceticus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhimurium*, *Staphylococcus lentus*, and *Listeria innocua* by the agar well diffusion assay. The sensitivity of the indicator strains was estimated based on the diameter of the inhibition zones. All pathogens were inhibited by 151 (98%) of the enterococcal isolates. Only one *E. faecalis* isolate was negative towards several bacteria - *E. coli*, *E. tarda*, *S. marcescens*, *S. enterica* and *L. innocua*. The maximum inhibition zones were observed in *A. calcoaceticus* and *S. lentus* with *E. faecium* and *E. faecalis* isolates (20.0 and 21.5 mm) and in *S. paucimobilis* with *E. faecalis* isolates (24.0 mm). Enterococci were isolated from Bryndza cheese from five different commercial distributors and no differences in antagonistic activity against indicator strains among isolates from individual distributors were observed. This work was supported by VEGA grant No. 1/2422/05.

Charakteristika laktobacilů izolovaných z potravin

Dušková M. (1), Karpíšková R. (2), Necidová L. (1)

(1) *Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno;* (2) *Centrum hygieny potravinářských řetězců Brno, Státní zdravotní ústav Praha*

V dnešní době představují bakterie mléčného kvašení, mezi něž zařazujeme také bakterie rodu *Lactobacillus*, významný a rychle se rozšiřující sektor potravinářského výzkumu i trhu. Laktobacily jsou významnými mikroorganismy i díky svým probiotickým vlastnostem, které pozitivně ovlivňují zdravotní stav člověka. Na druhé straně se však často podílejí na přenosu genů rezistence k antibakteriálním látkám a tvorbě biogenních aminů. Cílem práce bylo sledování frekvence výskytu laktobacilů v potravinách a jejich charakterizace. Byly vyšetřovány vzorky potravin s pravděpodobným výskytem laktobacilů (jednalo se o mléčné a masné výrobky z tržní sítě). Ke kultivaci laktobacilů byla použita různá kultivační média MRS, Rogosa agar a Tomato Juice agar. Sledování rezistence k antimikrobiálním látkám bylo provedeno diskovou difuzní metodou. Genotypová konfirmace izolátů laktobacilů byla provedena pomocí metody PCR s rodově specifickými primery LbLMA 1-rev a R16-1. K druhové identifikaci byla použita také metoda PCR založená na detekci nukleotidových sekvencí rozdílných pro jednotlivé druhy laktobacilů, vyskytujících se v oblasti mezi geny pro 16S a 23S rRNA. Rodová a druhová identifikace prováděná metodou PCR umožnila rychlou charakteristiku izolátů. Byla vytvořena sbírka kmenů, jejichž genetické vlastnosti budou dále podrobně studovány. Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Kmen *Geotrichum candidum* 4013 - zdroj biotechnologicky významných enzymů

Hlavsová K. (1, 2), Zarevúcka M. (2), Macková M. (1), Wimmer Z. (3)

(1) *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6;*

(2) *Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR vvi, Flemingovo náměstí 2, 166 10*

Praha 6; (3) Ústav experimentální botaniky, AV ČR vvi, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6

Geotrichum candidum 4013 je ubikvitně rozšířená kvasinka. Je to saprofyt, ale u jedinců s oslabenou imunitou se může stát sekundárním patogenem. Buňky kmene 4013 byly kultivovány při 30°C a otáčkách 260min⁻¹. *G. candidum* 4013 produkuje dvě induktivní lipasy. Extracelulární lipasu a lipasu vázanou na buňku. Lipasy mají rozdílnou substrátovou specifitu. Extracelulární přednostně hydrolysuje nenasycené mastné kyseliny a na buňku vázaná nasycené mastné kyseliny. Obě lipasy byly použity jako katalysátory hydrolysy oleje ze semen černého rybízu a) za atmosferického tlaku, b) za vysokého tlaku. Volné mastné kyseliny byly po katalyse extracelulární lipasou získány s 60% výtěžkem a po použití lipasy vázané na buňku s 37% výtěžkem. Obě lipasy byly použity jako katalysátory esterifikace racemické směsi cis- a trans-2-(4-methoxybenzyl)cyclohexan-1-olu. Za katalysy extracelulární lipasou vznikl produkt s optickou čistotou >99%, při reakci katalysované lipasou vázanou na buňku byla optická čistota >95%. Obě reakce proběhly s vysokou enantioselektivitou. Lipasy jsou používány při hydrolyse olejů bohatých na polynenasycené mastné kyseliny. Tyto kyseliny mají blahodárné účinky a jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu. Díky své vysoké enantioselektivitě jsou využívány, jako katalysátory při přípravě enantiomerně čistých látek. Autoři děkují za finanční podporu MŠMT (COST D30.001) a za podporu projektu 342/08/0015 VŠCHT v Praze.

Analýza novoizolovaného potenciálne probiotického kmeňa *Lactobacillus murinus* C

Koščová H., Zaliberová A., Urbančíková B., Bilková A.

Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Kalinčiakova 8, 832 32, Bratislava, Slovensko

Potenciálne probiotické baktérie sme izolovali zo žalúdočnej sliznice trojtýždňového jahňaťa chovaného na mliečnej strave. Identifikovali sme ich pomocou sekvenovania časti génu pre 16S rRNA. Zamerali sme sa na bližšiu charakterizáciu *Lactobacillus murinus*, ktorý sme porovnávali so zbierkovými kmeňmi *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, *Lactobacillus salivarius* CCM 7274 a *Lactobacillus plantarum* CCM 1904. Charakterizovali sme ich mikrobiologicky (prežívanie buniek po lyofilizácii, schopnosť prežívať v prostredí so zvýšenou koncentráciou žlčových solí a kyselín) a biochemicky (API 50CHL). Zisťovali sme ich povrchovú hydrofóbnosť (BATH-test). Všetky skúšané kmene laktobacilov (2 mg/ml) modulovali aktivitu ľudských mononukleových buniek in vitro. Najlepšie hydrofóbne vlastnosti mal *Lactobacillus murinus* (79,35 %). Ako hydrofóbny sa neprejavil *Lactobacillus plantarum* (26,34 %). Spomedzi testovaných kmeňov *L. murinus* najvýraznejšie stimuloval viaceré prejavy nešpecifickej imunity (fagocytová aktivita, fagocytový index, kandidacídna aktivita, baktericídna aktivita voči *E. coli*). Zistili sme priamu kandidacídnu účinnosť všetkých testovaných laktobacilov voči vybraným zbierkovým kmeňom *Candida albicans*. Na základe získaných výsledkov možno predpokladať, že po komplexnejšej analýze novoizolovaného kmeňa *Lactobacillus murinus* C, by sa tento kmeň mohol stať zložkou probiotických preparátov. Práca je podporená grantovou úlohou č. VEGA 1/4290/07

Vliv kmene *Enterococcus mundtii* EN3 na stabilitu majonézy a tatarské omáčky

Kučerová K., Miller P., Chumchalová J., Míková K.

VSCHT Praha, Ústav technologie mléka a tuků Technická 5 Praha 6, 16628

Kmen *Enterococcus mundtii* EN3 byl izolován z tatarské omáčky a vykazoval antibakteriální aktivitu vůči Gram pozitivním bakteriím. Jeho antibakteriální aktivita byla způsobena produkcí bakteriocinu II. třídy. Dále se u tohoto kmene testovala jeho rezistence k antibiotikům a produkce biogenních aminů. Tento kmen se vzhledem k své antibakteriální aktivitě použil jako protektivní kultura při výrobě majonézy a tatarské omáčky. Během pokusu se zjistilo, že kmen nebyl schopen dlouhodobě přežívat ve výrobku a nebyl schopen tam tudíž naprodukovat dostatečné množství bakteriocinu. Dále se provedl stejný pokus s přidavkem hrubého bakteriocinu jako konzervační látky. Z výsledků obou pokusů vyplývá, že účinek bakteriocinu byl větší.

Enterocin A-producing and probiotic strain *Enterococcus faecium* EK13 (CCM 7419) and its effect in chickens experimentally infected with *Salmonella enterica* ser. Enteritidis.

Lauková A. (1), Stropfiová V. (1), Herich R. (2), Pistl R. (2), Révajová V. (2), Levkut M. (2)

(1) *Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Slovakia;* (2) *University of Veterinary Medicine, Institute of Pathology, Komenského 73, 04001 Košice, Slovakia*

Domestic poultry constitutes the largest single reservoir of *Salmonella* in nature. Contamination can also occur during slaughtering. That is, to reduce such infections is in the paramount of interest. Bacteriocinogenic and probiotic strains represent a promising way to reduce this kind of contaminations. *Enterococcus faecium* EK13 is bacteriocin A, P producing strain (own isolate) which also possess probiotic properties. This strain was successfully applied in gnotobiotic Japanese quails to reduce the counts of *Salmonella enterica* ser. Duesseldorf SA31. Protective effect of EK13 strain was also noticed on the duodenal epithelium. In this experiment, a total of 100 3 days old chickens -ISA Brown birds were included. Feeding and water access were ad libitum. The birds - 4 groups in each group 25 birds: Control (C), EK13 (E), EK13 and *Sallmonella* (ES) and *Salmonella* (S). E and ES groups received the dose of EK13 strain (108cfu/ml) for 7 days. In the age 10 days, the birds were infected with SA31 strain (108cfu/ml). Sampling was at days 0-1, 2, 5, 7,16. Five chickens from each group were used. The experiment lasted for 4 weeks. EK13 strain sufficiently inhabited the chickens (\log_{10} cfu/g $4.4 \pm 1.2, 1.5$) in faeces and caecum at day 7. Even 2 weeks after non applying of EK13 strain its count were almost the same. The *Salmonella* counts were reduced (5.3 to 3.4 cfu/g) in ES group. In S group their counts were one order higher. Results funded by APVV-20-041605.

Probiotic and bacteriocinogenic strain *Enterococcus faecium* EF55 and its stability in the chickens experimentally infected with *Salmonella enterica* ser. Enteritidis

Lauková A. (1), Stropfiová V. (1), Szabóová R. (1), Herich R. (2), Révajová V. (2), Kokinčáková T. (2), Pisl J. (2), Levkut M. (2)

(1) Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Slovakia; (2) University of Veterinary Medicine, Komenského 73, 04001 Košice, Slovakia

Epidemiological studies have revealed that the major source of *Salmonella enteritidis* outbreaks in humans include contaminated poultry meat and eggs. The ability of *S. enterica* ser. Enteritidis to establish infection depends on e.g. their ability to attach, colonize and invade intestinal epithelial cells. Therefore, in an effort to prevent or reduce these infections, alternatives are searched. Probiotic and bacteriocinogenic strains have been suggested as suitable alternatives in this case. *Enterococcus faecium* EF55 was isolated from the crop of chickens and it possess the bacteriocinogenic and probiotic properties in detail studied previously by Stropfiová et al. (2003); it e.g. was found in sufficient amounts in Japanese quails after their experimental colonization. However, the aim of this work was to test its stability and reducing effect in chickens experimentally infected with *S. enterica* ser. Enteritidis. A total of 120, one-day old chickens, ISA Brown were divided into 4 groups: S group infected with *S. enterica* ser. Enteritidis PT4 (108cfu/ml) at day 8 of chicken age. EF group received 10⁹ cfu/ml of EF55 strain for 7 days, EFS group was infected with *Salmonella* and received EF 55 strain and 1 group was control. EF55 reached log₁₀ 5.18 cfu/g after 1 week and even at the end of experiment (21 days) the count was almost 2.0 cfu/g. Moreover *Salmonella* was reduced in SEF group of chickens in comparison to S group ($p < 0.01$). Study was founded by APVV-20-041605.

Vplyv baktérií mliečného kysnutia na rast *Escherichia coli* pri súběžnej kultivácii v mlieku

Liptáková D., Valík Ľ., Janovčíková L., Hudcová A.

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Oddelenie výživy a hodnotenia potravín, Radlinského 9, 812 37 Bratislava SR

Summary The growth of the *Escherichia coli* strain isolated from the sheep lump cheese alone and in co-culture with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* 145 was studied in relation with the temperature in the range from 10°C to 37°C. The minimal growth temperature of 9.5 °C was determined from secondary mathematical equation ($\mu = 0.0327T - 0.3101$; $R^2 = 0.9755$). The shortening of lag-phase of *E. coli* in dependence on the storage temperature was able to describe according to the equation: $\ln \text{lag} = -0.1184 * T + 4.0057$, ($R^2(\ln \text{lag}) = 0.9372$). The dependence of the growth rate and lag-phase duration of *E. coli* on temperature in sub-cultivations with *L. acidophilus* was characterized by the following equations: $\sqrt{\mu} = 0.0228 * T + 0.0598$ ($R^2(\sqrt{\mu}) = 0.9667$) and $\ln \text{lag} = -0.1738 * T + 4.6837$, ($R^2 = 0.908$). Primary modelling of the growth curves of two competitive organisms showed that only *L. lactis* inoculum at 107 CFU.ml⁻¹ temperature of 18 to 21°C could suppress the growth of *E. coli* and kept its numbers during stationary phase at maximal density of 104 CFU.ml⁻¹. Combined effect of initial inoculation, growth of *L. lactis* and incubation temperature on *E. coli* was described with the highly significant second order mathematical equation: $\mu = 0.02104 + 0.000693 * T^2 - 0.000727 * T * N(\text{Lc}0)$; ($R^2(\mu) = 0.98$). Acknowledgements Supported by the Slovak Research and Development Agency, Contract No. APVV-20-005605 and by the National Grants No. VEGA 1/3488/06.

Rast *Staphylococcus aureus* a zákysových kultúr / Growth dynamics of *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria in milk co-culture

Medved'ová A., Valík Ľ., Bajúsová B.

Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovenská republika

Abstract: The behaviour of *Staphylococcus aureus* and inhibition effect of two cultures of lactic acid bacteria were studied in co-culture in milk at 25 °C. Both, the Fresco and the culture A showed inhibition effect on *S. aureus*. The amounts of LAB inoculum necessary for *S. aureus* growth suppression were found and described by highly significant correlation. The up growth of *S. aureus* in milk in co-culture with Fresco culture (Danisco, Copenhagen, Denmark) was related with initial number of LAB by following relation: $N_{max_SA} - N_{0_SA} = -0.7258 * N_{0_Fr} + 5.6748$ ($R_{2N_{max_SA} - N_{0_SA}} = 0.9281$). Similarly, the second LAB culture A showed significant influence on the same strain of *S. aureus* under relationship $N_{max_SA} - N_{0_SA} = -2.1814 * N_{0_A} + 12.605$ ($R_{2N_{max_SA} - N_{0_SA}} = 0.9564$). The growth of starters and lactic acid as the main products of their metabolism had inhibitory effects on the growth of *S. aureus* 2064 under study. For example, the higher addition of the culture A and Fresco culture (> 105 CFU/ml and >106 CFU/ml, respectively) allowed *S. aureus* to increase its numbers only about 1 log. Pod'akovanie: Táto práca bola finančne podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-20-005605 a z grantu MČ VEGA č. 1/3488/06.

Izolace bakteriocinu kmene *Enterococcus mundtii* EN3

Miller P., Svoboda M., Kučerová K., Kodíček M., Chumchalová J.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Technická 5 166 28 Praha 6 - Dejvice

Protektivní kultury a jimi produkované antimikrobiální látky nabízejí široký potenciál pro použití jako konzervant přírodního původu. Kmen *Enterococcus mundtii* EN3 izolovaný z Tatarské omáčky produkuje termostabilní bakteriocin s širokými antimikrobiálními účinky (19 z 20 testovaných kmenů laktobacilů, 3 z 5 laktokoků, *Bacillus cereus* DMF2001 a *Listeria monocytogenes* CCM5576), aktivní v širokém rozmezí hodnot pH (2-11) a koncentrace NaCl (0-5 % hm.). Tento peptid byl pomocí metody adsorbce bakteriocinu na buněčnou stěnu separován od kultury a media, částečně přečištěn na Sep-Pak cartridge s reverzní fází C18 od firmy Watres (33% CH₃CN) a pak přečištěn a izolován na HPLC koloně s reverzní fází C18 od firmy Watrex (250x8 mm, Nucleosil 120-5) použitím lineárního gradientu CH₃CN. Pomocí MALDI-TOF MS byla stanovena jeho monoizotopická relativní molekulová hmotnost ne 3352,5.

Výskyt genotypů *S. aureus* u izolátů z potravin a jejich schopnost vyvolat alimentární intoxikaci

Pospíšilová M. (1), Belušíková Z. (2), Jakubcová L. (1), Karpíšková R. (1)

(1) *Centrum hygieny potravinových řetězců Brno, Státní zdravotní ústav Praha;* (2) *Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Přítomnost *S. aureus* v potravinách představuje potenciální riziko ohrožení zdraví konzumenta díky schopnosti produkce stafylokokových enterotoxinů (SEs), které vznikají v potravinech jako metabolické produkty při množení těchto bakterií. Mezi potraviny často dávané do souvislosti se stafylokokovou enterotoxikózou patří maso (hovězí, vepřové, drůbeží) a masné výrobky (šunka, salámy, „hotdogy“), lahůdkové saláty (šunkový, kuřecí, bramborový), cukrářské výrobky s krémy a mléčné produkty (sýry). Při podezření na stafylokokovou enterotoxikózu je důležité zajistit vyšetření inkriminované potraviny jak na přítomnost *S. aureus*, tak na výskyt SEs. Ty mohou být v potravinech přítomny i v případě, že bakterie *S. aureus* byly inaktivovány. Pro identifikaci *S. aureus* jsme použili metodu PCR zaměřenou na detekci specifického DNA fragmentu (Martineau et al., 1998). Pro určení příčiny alimentárního onemocnění je dostatečným důkazem detekce SEs v potravinech. K tomu jsou běžně používány reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA), imunochemické metody (ELISA a ELFA). Nevýhodou těchto metod je jejich využití jen pro detekci klasických SEs (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), (Letertre et al., 2003). Byly již zaznamenány případy onemocnění vyvolané novými typy SEs, pro které zatím nejsou dostupné komerční detekční metody. Pro průkaz přítomnosti genů kódujících příslušné SEs je proto nutné využít jiné metody např. PCR. Práce byla realizována za finanční podpory projektu MŠMT 2B06048.

Zdravotné riziko zo sušenej mliečnej detskej výživy

Sirotná Z., Suchánová M., Šimonyiová D.

Úrad verejného zdravotníctva SR, Trnavská cesta 52, 826 45 Bratislava

Výber surovín pre výrobu dojčenskej výživy a výrobný proces podlieha prísnyim kritériám a kontrole. Zdravotné riziko z konzumácie kontaminovanej sušenej mliečnej výživy je nezanedbateľné. Vedecká skupina pre biologické riziko (BIOHAZ Panel) Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EÚBP) vydala v roku 2004 stanovisko k mikrobiologickým rizikám v detskej sušenej mliečnej výžive, podľa ktorého sú *Salmonella* a *Enterobacter sakazakii* sledované ako najnebezpečnejšie mikroorganizmy. *Enterobacter sakazakii* je patogén z čeľade *Enterobacteriaceae* a je dávaný do súvisu so zriedkavými, ale často smrteľnými formami neonatálnych meningitíd, otráv a nekrotizujúcich zápalov tráviaceho traktu. Tieto formy meningitíd sa vyznačujú vysokou úmrtnosťou, až 40-80%. Väčšina ochorení postihuje novorodencov mladších než 2 mesiace. Prvé prípady meningitídy, dávanej do súvislosti s týmto mikroorganizmom, boli zaznamenané v roku 1961. V rámci štátneho zdravotného dozoru bolo v roku 2006 vyšetrených v laboratóriách mikrobiológie životného prostredia úradov verejného zdravotníctva SR 387 vzoriek sušenej mliečnej dojčenskej výživy. Na detekciu sa použila štandardná metóda doporučená Nariadením EU 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny podľa ISO/ DTS 22964: Mlieko a mliečne produkty. Detekcia *Enterobacter sakazakii*. Ani v jednej vzorke v rámci vyšetřovaného súboru vzoriek odobratých z distribučnej siete lekární v spádových oblastiach RÚVZ v SR nebol izolovaný *Enterobacter sakazakii*.

Lyzé laktokoků v modelových systémech pufru a kultivačních médií

Šviráková E., Abrlová M., Hlavsová B., Plocková M.

Ústav technologie mléka a tuků, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Lyzé bakterií mléčného kvašení (BMK) vychází z degradace peptidoglykanu buněčných stěn endogenními hydrolysami - lyziny. Bylo prokázáno, že hodnocení lyzí BMK je závislé na použité metodě (Lortal, Chapot-Chartier, 2005). Práce byla zaměřena na stanovení lytických vlastností vybraných kmenů *Lactococcus lactis* (AM 2, NIZO R5, HMM 81 a NIZO B643) v modelových systémech citrátového pufru, kultivačních médií (bujón LM17, agar GM17). U kmenů, kultivovaných v citrátovém pufru při teplotě 13 °C po dobu 12 dní, bylo zjištěno, že všechny kmeny byly vysoce lytické; buněčné lyze se pohybovaly v rozmezí 34-67 %. Při kultivaci kmenů v bujónu LM17 s přídatkem mitomycinu C (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 µg.ml⁻¹) při teplotě 30 °C po dobu 8 h, bylo zjištěno, že při použití nejvyšší koncentrace mitomycinu C (2,0 µg.ml⁻¹) byly u všech kmenů zjištěny nejvyšší buněčné lyze. U laktokokových kmenů kultivovaných na povrchu agaru GM17 (roztěr 0,1 ml), obsahujícího komerční lyzát buněk *Micrococcus lysodeicticus* (0,2 % hm.) při teplotě 30 °C po dobu 48 h, bylo zjištěno že, u v okolí kolonií všech laktokoků byly detekovány lytické zóny o průměru 1,5-3,0 mm. Po 6 dnech kultivace došlo ke zvětšení průměru lytických zón; největší průměr zóny měřil 12,0 mm. Lortal S., Chapot-Chartier M.P.: Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy J.* 15, 857-871 (2005).

Produkce biogenních aminů u vybraných bakterií izolovaných z povrchu drůbeže

Vaňátková Z., Buňková L., Doležalová M., Otrísal P., Buňka F.

*Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně Fakulta technologická náměstí T. G. Masaryka
275 762 72 Zlín Česká republika*

Biogenní aminy (BA) se nachází v potravinách jako produkty dekarboxylačních procesů mikroorganismů, které se zde mohou vyskytovat přirozeně, jsou přidávány z technologických důvodů anebo jsou kontaminanty. Čeleď Enterobacteriaceae zahrnuje řadu mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou (DA). Sledované mikroorganismy (3 kmeny *Proteus vulgaris*, 3 kmeny *Escherichia coli*, 2 kmeny *Pantoea* sp., 2 kmeny *Klebsiella oxytoca*, 2 kmeny *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Leclercia adecarboxylata*, *Yersinia enterocolitica*) byly izolovány z povrchu kuřat. BA byly stanovovány v masoseptonovém bujónu po 48hodinové kultivaci mikroorganismů při teplotě 30°C nebo 37°C v závislosti na druhu mikroorganismu. Jako pozitivní kontrola byla použita *Serratia marcescens* CCM303. Obsah BA byl stanoven i v bujónu prostém inokulace mikroorganismy. Po extrakci kyselinou trichloroctovou (5 % w/v) byly BA stanoveny iontově-výměnnou kapalinovou chromatografií po postkolonové derivatizaci ninydrinovým činidlem. Posouzení DA bylo provedeno podle obsahu BA v inkubovaném bujónu: produkce nízká (do 0,05 mmol/l), střední (0,05 až 0,50 mmol/l) a vysoká (nad 0,5 mmol/l). Produkce histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu nebyla u zkoumaných kmenů významná. Střední produkce putrescinu byla stanovena u třetiny posuzovaných kmenů. Vysoká produkce kadaverinu se vyskytla u dvou třetin sledovaných kmenů. U dvou kmenů byla pozorována produkce agmatinu. Poděkování MŠMT: MSM 7088352101.

Development of Enzymatic Biosensors for Detection of Halogenated Environmental Pollutants

Bidmanová Š. (1), Prokop Z. (1), Kuncová G. (2), Bolyó J. (2), Damborský J. (1)

(1) Loschmidt Laboratories, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5/A4, 625 00 Brno; (2) Department of New Process in Chemistry and Biotechnology, Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of Czech Republic, Rozvojová 2, 165 02 Praha

Haloalkane dehalogenases (EC 3.8.1.5) are bacterial enzymes able to remove halogen from halogenated aliphatic compounds by a hydrolytic replacement. Halogenated compounds are dangerous for living organisms due to toxic, genotoxic and teratogenic effects. There is growing need for sensitive, rapid and in situ methods for monitoring of these hazardous pollutants. Whole-cell fiber optic biosensor for detection of 1,2 dichloroethane has been developed by Campbell et al. (2006). This project was focused on development of cell-free enzymatic fiber optic biosensor with the aim to increase selectivity and reproducibility of biosensors for detection of halogenated compounds. Fluoresceinamine-based pH optode was prepared and effects of different factors, e.g. way of storage or amount of fluorescence dye, were investigated to attain stable signal. Developed pH optode provided linear response in the pH range from 3.0 to 6.6. Three different immobilization methods were tested with haloalkane dehalogenase LinB to ensure tight proximity of enzyme and transducer: immobilization in glutaraldehyde, sol-gel and ORMOCER. Cross-linking with glutaraldehyde was selected for immobilization of LinB in biosensors and additional parameters, e.g., composition of reaction mixture and cross-linking time, were optimized. The most optimal immobilized variant achieved 62% activity of enzyme in solution. Reference: Campbell D.W., Müller C., Reardon K.F. (2006). *Biotechnol. Lett.* 28: 883-887.

Současný stav a nové trendy výzkumu a využití mikroorganismů v ekotoxikologii

Bláha L., Hilscherová K., Hofman J., Čupr P., Holoubek I.

Masarykova univerzita, RECETOX, Kamenice 3, 62500 Brno

Mikroorganismy mají zásadní postavení jak ve výzkumu tak v praktickém a rutinním hodnocení bezpečnosti cizorodých látek i kvality různých environmentálních matric. Předkládaný referát shrne v první části východiska a současný rámec využívání různých typů mikroorganismů (bakterie, jednobuněčný fytoplankton, kvasinky atd.) v komplexním hodnocení prostředí, zejména z pohledu kvality a zdraví ekosystémů = ekotoxikologie. Kromě současných praktických a právních aspektů (REACH nebo požadavky Rámcové direktivy EU pro vody), budou na vybraných příkladech současných studií z našich laboratoří prezentovány možnosti využití nových specifických mikrobiálních testů. Diskutovány budou kapacity kinetických luminiscenčních testů s bakteriemi (Flash test) při sledování zatížení složitých komplexních matric (sedimenty, půda) a využití při remediacích. Prezentovány budou také principy a praktická užití kvasinkových reporterových biotestů pro sledování látek narušujících hormonální regulace a výzkum endokrinních disruptorů. Diskutovány budou také limity a současné omezující faktory, kdy i přes obecně se zlepšující povědomí, existují stále významné rezervy v širším využití ekotoxikologických metod při hodnocení kvality prostředí ČR. Autoři příspěvku oceňují podporu výzkumu ekotoxikologie ze strany MŠMT (VZ INCHEMBIOL) a GAČR (grant 525/05/P160).

Transformation of halogenated aromatics by plants and bacteria – consequences of plant-microbe interactions

Macek T. (1), Francova K. (2), Uhlík O. (1, 2), Beranova K. (2), Vrchotová B. (1, 2), Lovecká P. (1), Najmanová J. (1, 2), Zlámalíková J. (2), Stiborová H. (2), Rezek J. (1, 2), Demnerová K. (2) and Macková M. (1, 2)

(1) Inst. of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, Flemingovo n. 2, 166 10, Prague, Czech Republic, (2) Dept. of Biochemistry and Microbiology, Fac. Food and Biochemical Technology, ICT Prague, Technická 5, 166 28 Prague, Czech Republic,

Bacteria and plants usually use different pathways and enzymatic systems for decomposition of xenobiotics, but naturally they exist together and mutually support their nutritional, growth demands and detoxification abilities. The objective of this study was to compare biodegradability of PCBs by individual species (plants, bacteria) and to follow further transformation of the products and intermediates and to find potential metabolic interactions leading to further decomposition of intermediates of bacterial and plant PCB metabolism. To describe the fate of PCBs in complex biological systems and to understand the mechanisms involved, we studied degradation of monohydroxychlorobiphenyls (plant intermediates of PCB degradation) by bacterial enzymes of upper biphenyl pathway isolated from PCB degrading bacteria exhibiting different substrate specificity. Furthermore the efficiency of degradation of bacterial products, mono, di, and tri-chlorobenzoic acids, and their fate in plants, was studied. In further experiments plants were cultivated in real long-term contaminated soil. The effect of different plant species on PCB degradation and microbial development in rhizosphere was followed. Microbial diversity was analysed by TTGE and SIP methods giving real view on genotypic and phenotypic properties of rhizosphere bacteria. Acknowledgement: The work was sponsored by the grant MSMT grants NPVII 2B06151, OC117-COST 859 and research project Z40550506.

Mutagenicity bioassays for genotoxicity assessment of pyrometallurgical wastes

Malachová K. (1), Pavlíčková Z. (1), Lešková J. (2)

(1) Department of Biology and Ecology, University of Ostrava, Dvořákova 7, 701 03 Ostrava, Czech Republic; (2) Nanotechnology centre, VŠB-Technical university Ostrava, 17.listopadu 15, 70833 Ostrava-Poruba

The study is focused on genotoxicity assessment of dusts and sludges originating during purification of waste gases from pyrometallurgical plants (oxygen converter, open-heart furnace, blast furnace, and electric-arc furnace). The samples studied are multicomponent with high content of metals and PAHs. Two detection systems the SOS Chromotest and the Ames Salmonella typhimurium His- test with and without metabolic activation were employed. According to the experimental results, the highest mutagenicity after metabolic activation was observed for the oxygen converter sludge. Nonetheless, other samples studied were potentially mutagenic as well. The bioassays without metabolic activation revealed no mutagenicity, thus we can assume that the samples do not contain any direct mutagens. Due to the fact, that the production of these wastes in Moravian-Silesian region reaches up to hundred of thousands of tons annually, therefore the mutagenicity testing is necessary to protect environment against potential adverse effects. Obtained results are significant as well in term of retrieval of new technologies allowing amount minimizing of disposed dangerous wastes. Key words: Mutagenicity, Salmonella typhimurium His- test, SOS Chromotest, pyrometallurgical wastes, PAHs Acknowledgement: The projects GACR 104/05/2296, GACR106/07/1436 funding this study are greatly acknowledged.

Role exopolymerních látek v bioremediačních technologiích

Mikeš J. (1), Siglová M. (1), Minařík M. (2)

(1) EPS, s.r.o. Přílepská 1692, 252 63 Roztoky u Prahy; (2) EPS, s.r.o. V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice

Z pohledu bioremediačních technologií je tvorba exopolymerních látek a studium jejich vlastností zajímavé z několika pohledů. Významně s ní souvisí v současnosti intenzivně studovaná oblast mikrobiálních biofilmů, kam spadá i hledání jejich vhodného technologického využití a zefektivnění stávajících technologií založených na metodách technické mikrobiologie. Dále se exopolymery jeví jako velice účinný typ sorbentů pro zachycení různých typů toxických kovů z prostředí a ukazuje se, že jejich podíl na biosorpčních procesech je větší, než se jim dosud přisuzovalo. Ojedinělé fyzikálně-chemické vlastnosti exopolymerů některých mikrobiálních taxonů je předurčují využít je jako biosurfaktanty, povrchově aktivních látky, které mohou zvyšovat mobilitu a biologickou dostupnost nepolárních polutantů. Nezanedbatelná je rovněž ochranná role exopolymerů pro mikroorganismy ve stresových podmínkách. Přednáška se zaměřuje na shrnutí dosavadních experimentálních poznatků zejména v oblasti interakce exopolymerů produkovaných eukaryotními mikroorganismy (kvasinky) s vybranými ionty toxických kovů (měď, olovo, zinek, kadmium, nikl, kobalt), přináší přehled metod použitých při kvantifikaci jejich produkce a ukazuje další směry, kde jejich uplatnění napomáhá bioremediačnímu procesu (biodegradace ropných látek).

Aerobní degradace tert-butyl(methyl)etheru (MTBE)

Pazlarová J., Vošahlíková-Kolářová M.

VŠCHT, FPBT, Ústav biochemie a mikrobiologie, technická 5, Praha 6

Kontaminace životního prostředí je zvyšovaná výfukovými plyny spalovacích motorů. Volba vhodného aditiva je hlavní cestou, jak snížit škodlivé emise. Aditiva s příměsí kovů byla v devadesátých letech nahrazena látkami s etherickou vazbou a největšího rozšíření dosáhl relativně levný terc-butyl(methyl)etheru (MTBE). Reformulované benzíny (RFG), které splňují přísné požadavky z hlediska emisí mají nízkou odparnost, malý obsah aromátů, velmi nízký obsah síry a zvýšený obsah kyslíkatých složek. Ty jsou tvořeny především ethery jako je tert-butyl(methyl) etheru (MTBE) a další. Česká republika produkuje zhruba 92 000 tun MTBE ročně. Hlavní cesta, kterou se MTBE do životního prostředí dostává jsou unikající podzemní nádrže pohonných hmot a úniky při haváriích. V naší laboratoři jsme izolovali několik bakteriálních konsorcií a kmenů schopných degradace této látky pomocí opakovaných kultivací v přítomnosti MTBE. Sledování růstu vybraných kultur v přítomnosti MTBE bylo provedeno pomocí Bioscreenu®. Schopnost mikroorganismů degradovat MTBE jako jediný zdroj uhlíku nebo kometabolicky, byla měřena plynovým chromatografem s FID detekcí. Budou představeny metabolické dráhy vedoucí k odbourávání MTBE. Toxicitu a genotoxicitu MTBE a meziproduktu degradace terc-butylalkoholu (TBA) jsme ověřili bioluminiscenčním testem, testem inhibice růstu kořene *Lactuca sativa* a Amesovým testem. K identifikaci vybraných izolátů bylo použito porovnání sekvencí úseků 16S r DNA v databázi BLAST.

Identifikace a výskyt cyanobakteriálního toxinu cylindrospermopsinu ve vodách ČR

Bláhová L., Oravec M., Klánová J., Maršálek B., Bláha L.

Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, Botanický ústav AVČR a Masarykova univerzita (RECETOX), Kamenice 3, 62500 Brno

Eutrofizace prostředí vyvolává masové rozvoje některých zástupců planktonních cyanobakterií (sinic) ve sladkovodních nádržích celého světa včetně ČR. Mnohé cyanobakterie jsou producenty řady vysoce toxických látek, které mohou (po rekreační expozici nebo přítomností ve zdrojích pitné vody) negativně ovlivňovat také lidské zdraví. V minulosti byla velká pozornost věnována peptidům microcystinům (hepatotoxiny a nádorové promotory), pro které již i v ČR existuje limit pro pitné vody 1 mikrogram/L. V souvislosti s fenoménem globálního oteplování však existuje oprávněné podezření, že do střední Evropy začínají expandovat nové (tropické) druhy cyanobakterií (např. *Cylindrospermopsis raciborskii* původně popsaný z Austrálie nebo méně běžné druhy vláknitých cyanobakterií rodu *Aphanizomenon* apod.), které mohou být producenty dalších "exotických" toxinů. Taxonomické a instrumentální analýzy (HPLC-DAD/MS) vytypovaných vzorků z plošného monitoringu ČR z let 2004-2006 potvrzují výskyt derivátů cylindrospermopsinu v řadě nádrží a rybníků a je zřejmá asociace s výskytem druhu *A. flos aqua*. Naše studie je první, která potvrzuje výskyt cylindrospermopsin-produkujících cyanobakterií v širším regionu střední Evropy a indikuje možná zdravotní rizika související s novými expanzivními druhy sinic. [Podporováno z prostředků MŠMT IM6798593901 a výzkumného záměru BÚAV ČR č. AV0Z60050516].

Selekce ligninolytických hub pro biodegradace endokrinně disruptivních látek

Cajthaml T., Pojerová E.

Mikrobiologický ústav, v.v.i., AVČR, Vídeňská 1083, Praha 4, 142 20

Houby bíle hniloby *Bjercandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* a *Irpex lacteus* byly testovány pro možné využití při degradaci endokrinně disruptivních látek (ED): Nonylphenol (NP), Bisfenol A (BA) a 17α -Ethinylestradiol (EE). Schopnost biodegradace byla tedy testována při počátečních koncentracích 3, 10, 10 ppm (NP, BA, EE; tekuté médiu, statická kultivace) a tyto látky byly odbourávány jednoznačně nejlépe kulturami *P.ostreatus* a *I.lacteus*. Snížení endokrinně disruptivní aktivity bylo sledováno pomocí rekombinantního kvasinkového testu. Kvantitativní analýzy degradace byly provedeny pomocí HPLC a degradační produkty byly kvalitativně charakterizovány s využitím GC/MS. Toxický efekt těchto látek na houbové kultury byl testován v tekutém médiu při koncentracích 3, 10, 20 ppm, pro každou látku. Možný indukční efekt ED byl monitorován produkcí extracelulárních enzymů: lakasy (Lac), mangan peroxidasy (MnP) a lignin peroxidasy (LiP). Tato práce vznikla za podpory grantu KJB600200613 Grantové agentury Akademie věd České republiky.

Rhodanese–type enzymes of bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Houser J. (1), Janiczek O. (1), Wimmerová M. (1, 2)

(1) Institute of biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech republic (2) National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech republic

Acidithiobacillus ferrooxidans is the best–studied extremophilic bacterium used in biohydrometallurgy, e.g. metal mining using bacterial leaching. It plays an important role in mining of such metals as copper, cobalt or zinc. Over fifty years research has discovered much about life processes of *A. ferrooxidans*, but there still remain many questions unanswered, especially those connected with sulphur metabolism. Rhodanases or rhodanese–like enzymes respectively, are members of sulphurtransferases group of enzymes. They transfer sulphur atom from thiosulphate to cyanide, creating sulphite and thiocyanate (rhodanide). However, the exact function of many rhodanese–like enzymes remains unknown. We have identified eight open reading frames corresponding to rhodanese–like enzymes in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome (TIGR, www.tigr.org). Detailed bioinformatics research and PCR optimisation of all putative rhodanases led to one recombinant protein. Expression of the protein was optimised using different strains and expression condition and purification of the protein from inclusion particles was established. Preparing of this enzyme is the first, but definitely the most important step for characterization of this enzyme in future and determination of its function in *A. ferrooxidans* metabolism. This project is supported by MŠMT ČR (MSM0021622413) and GA ČR (GA525/04/1309).

Biodegradation of aniline in the aquatic environment using suspended and biofilm bacterial population

Hrdinova J., Jirku V., Cejkova A., Masak J., Mikes J.

Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering Institute of Chemical Technology Prague Technická 5, 166 28 Prague Czech Republic E-mail: jitka.hrdinova@vscht.cz Phone: +420 220 444 108

Aniline is a widely distributed environmental pollutant resulting from the manufacture of dye materials and agricultural chemicals such as herbicides, fungicides. Because of its toxic and recalcitrant nature and the wide application of aniline containing chemicals, aniline is considered to be an increasing threat both to the environment and to human health. Thus, the fate of aniline in the environments is of great concern. The screening of bacterial species (A11, A21, A22 – all *Ochrobactrum* sp., A1100 - *Comamonas* sp., *Rhodococcus erythropolis* and AK (activated sludge) was performed to compare aniline biodegradation abilities of suspended and attached populations. The utilized aniline uptake was studied using various cultivation conditions (pH, temperature etc.) and cells natural adherence to polyethylene carriers was studied as well. The capacity to utilize aniline by the A21 and A22 strains was found to be insufficient. On the other hand the strains A11, AK, A1100 as well as *Rhodococcus erythropolis* utilized 20-100% aniline in the range of temperatures from 16 to 29 °C. The highest decrease of aniline concentration was found at pH 6 (all strains 70-100%). The strains A11, AK, A1100 and *Rhodococcus erythropolis* are able to colonize the polyethylene carriers in stirred cultures however the most stable and compact biofilm was formed by both A11 and *Rhodococcus erythropolis* after 6 week cultivation.

Bacterial community determination and variability of heavy metal resistance determinants in cultivable and non-cultivable portions of heavy-metal-contaminated soil

Karelová E., Harichová J., Chovanová K., Ferianc P.

Institute of Molecular Biology of the Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, SK-845 51 Bratislava, Slovakia

Heavy metals are highly persistent in the environment and are known to alter soil ecosystem diversity, structure and function. In the present work we have tried to analyse bacterial assemblage structure and variability of heavy-metal resistance genes in heavy-metal-contaminated soil. 42 Gram-negative non-fermentative isolates from heavy-metal (nickel, cobalt, zinc, cadmium) contaminated soil survived sub culturing and were identified by biochemical tests. A total of 15 species belonging to 9 genera (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*) were identified and assigned to 4 broad taxonomic groups (Bacteroidetes, Alfa-, Beta- and Gammaproteobacteria). However, the use of nucleic acid-based methods assigned isolates to *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus epidermidis* and to two unknown species. In addition, the representatives of *Acinetobacter* spp., *Pasteurella* spp. and *Pseudomonas* spp. contained *czc*- and *ncc*-like heavy-metal-resistance genes. On the other hand, non-cultivable bacterial assemblage represented 13 different unknown, phylogenetically distant bacterial clones and 18 different, phylogenetically distant *ncc*-like heavy-metal-resistance genes with considerable genetic variability. Acknowledgements This work was supported by VEGA Grant No. 2/7022/7, APVV No. 51-0248-05 and APVV No. 20-0540-05.

Effect of phenolic compounds on cellulase catalyzed reaction: kinetic characterization in continuous and discontinuous reactors

Malandra A. (1,2), Cantarella M. (2), Gallifuoco A. (2), Spera A. (2), Cantarella L. (3)

(1) Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation, Prague; (2) Department of Chemistry, Chemical Engineering and Materials, University of L'Aquila, Italy; (3) Department of Industrial Engineering, University of Cassino, Cassino (FR), Italy

Treatment and disposal of (OMW) formed during olive oil production is presently a serious environmental problem since more than 1.800.000 m³ of OMW are produced yearly in ITALY. The wastewaters are characterized by the presence of carbohydrates, such as cellulose, and toxic compounds and pollutants such as phenols, fatty acids, volatile acids, poly alcohol, poly phenols. Phenolics are mainly responsible for the toxicity towards bacteria, plants and animals. The commercial enzymatic complex Safizym was proved to be sufficiently active towards cellulosic compounds. The phenolic compounds have variable degree of toxicity. The p-hydroxy benzaldehyde, cumaric acid, and protocatechuic acid had the most damaging effect in the hydrolysis of cellulose. Therefore it is advisable to operate with an enzyme excess in order to maintain a sufficiently high biocatalytic activity to reach acceptable conversion. Conversely a conventional phenol detoxification should be operated preventively. The runs in CSMR indicated that enzyme is sensitive when the phenolic compound concentration is increased with time.

Obtaining and properties of bacteria utilizing some carbohydrates

Muchová M., Růžička J., Julinová M., Doležalová M.

Tomas Bata University in Zlin Faculty of Technology Department of Environmental Protection Engineering TGM 275 762 72 Zlin

In view of structural diversity of microbial carbohydrates and their properties, polysaccharides have found a wide applicability in food industry, pharmacy and other industrial fields as stabilizers, emulgators or gelling agents. The examples of industrially produced carbohydrates are xanthan, gellan, dextran, pullulan, curdlan and yeast glucan of which xanthan and gellan belong to the types produced in major amounts. Xanthan and gellan, because of their applications, may get into waste waters or soils, so this study was designed to obtain xanthan- and gellan-utilizing bacteria occurring in these environments. Xanthan utilizing bacteria derived from activated sludge and soil were isolated by spreading several inoculums on some types of solid media including xanthan gel. Suspected colonies were re inoculated on the same media and tested for xanthan utilization. Bacteria isolated from both sample types were aerobic, gram-variable and spore-forming rods (members of Firmicutes phylum). For the isolation of the gellan degraders a series of Petri plates with gellan gel were prepared and several dilutions of enriched sludge or soil were inoculated on them. Gellan degrading microbes formed pits in the gels from which appropriate bacteria could be easily isolated by common microbiological procedure. Our work leads to improving methods for isolation of carbohydrate-utilizing bacteria which are insufficiently described in scientific literature till now.

Repeated induction of *Comamonas testosteroni* for trichloroethylene degradation

Růžička J., Muchová M., Dvořáčková M.

Tomas Bata University in Zlin Faculty of Technology Department of Environmental Protection Engineering TGM 275 762 72 Zlin

Trichloroethylene (TCE) is a recalcitrant solvent occurring in many groundwaters and its microbial degradation is a promising way to water decontamination. Phenol-, toluene- or methane-utilizing bacteria belong to the best known degraders of the compound; however, their abilities to TCE transformation are usually time-limited due to inducible nature of appropriate enzyme(s). Capability of phenol utilizing bacterium *Comamonas testosteroni* CCM 7350 to TCE mineralization and its use for repeated TCE degradation were studied throughout the work. Determination of inorganic chlorides showed that more than 97% of chlorine was mineralised; negligible amount of trichloroacetic acid (0.15 mol %) was found as a side product of degradation. The levels of TCE removal during three repeating steps of degradation under growing condition were then examined. Lactate and phenol were used as growth and inductive substrate, respectively, and TCE (10 mg/l) removals and cell densities in each step were determined. The results showed that the highest level of degradation (80.8%) was reached in the first step of the process whilst slightly lower TCE removals were found in the second and the third steps (70.0 and 60.3 %, respectively). Data suggested slight detrimental effect of the process on used cells; on the other hand, regenerations of cells ability to TCE degradation in the second and the third steps were sufficient to potential use of *C. testosteroni* CCM 7350 for in situ bioremediation.

The influence of humic substances on bacterial cell wall composition and biodegradation of phenol

Schreiberová O., Masák J., Čejková A.

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Ústav kvasné chemie
a bioinženýrství Technická 5, 166 28, Praha 6*

Humic substances, the heterogenous organic byproducts of microbial metabolism belong to the most widely distributed organic materials in the environment. Recently, they were found to possess the ability to protect some microorganisms against unfavourable external conditions. Effects of humic substance oxyhumolit on a procaryotic microorganism the bacteria *Rhodococcus erythropolis* were studied, especially the possible ability of the humic substances to influence the growth in the presence of high concentration of harmful compounds (specifically phenol) and consequently also the biodegradation of this substance. Permeability, hydrophobicity, the content of mycolic acids in the cell envelope and degradation rate of phenol by two strains of bacteria *Rhodococcus erythropolis* grown under different conditions in the presence of oxyhumolit were examined. The presence of oxyhumolit influenced growth, composition and properties of *Rhodococcus erythropolis* cell wall, when population grew on different concentrations of phenol. The presence of humic substances lead to an increased uptake of hydrophobic substances and also the hydrophobicity of cells was increased. The analysis of mycolic acid in the cell wall has shown that the presence of humic substances leads to an increased occurrence of saturated mycolic acids. The growth of *Rhodococcus erythropolis* under chemical stress was favourably affected by the presence of oxyhumolit and also the degradation rates of phenol were increased.

Endokrinní disruptory - časovaná nálož v ekosystému

Siglová M. (1), Minařík M. (2), Mikeš J.(1)

(1) EPS, s.r.o. Přilepská 1692, 252 63 Roztoky; (2) EPS, s.r.o. Hutník 1403, 698 01 Veselí nad Moravou

Toxikologické charakteristiky nových environmentálních polutantů patřících do skupiny endokrinních disruptorů (např. bisfenol A, polybromované difenylétery, ftaláty) nás vedou k závěru, že je nutné začít hledat způsoby jejich eliminace ze životního prostředí. V zásadě je možné volit ze dvou obvyklých technologických přístupů. Fyzikálně-chemické prostředky nápravy životního prostředí jsou z hlediska členého využití člověkem vývojově starší, avšak z hlediska ekonomického většinou nákladnější než-li bioremediační postupy. Navíc kontaminace životního prostředí BPA, PBDE nebo ftaláty spíše vyhovuje definici difúzního znečištění, kdy se polutant nachází na velké ploše v nízké koncentraci, ale má závažný dopad na ekosystém. V těchto případech bývá přednostně uplatňován biologický způsob dekontaminace. Společnost EPS zahájila výzkumný program týkající se biodegradace vybraných esterů kyseliny ftalové. Laboratorní práce vedou dvěma paralelními směry výzkumu, jejichž cílem je buď izolovat vhodné kmeny vybavené biodegradačními schopnostmi z přirozené matrice kontaminované ftaláty nebo adaptovat sbírkové kmeny s bioremediačním potenciálem a následně získat ucelený obraz o jejich metabolických a fyziologických vlastnostech. Výsledkem studie by měl být soubor vhodných bioremediačních taxonů s potenciálem využít jako svůj růstový substrát, který by měl následně sloužit jako základ nově vyvíjeného bioremediačního postupu.

Aktivita půdních mikroorganismů v lokalitě zatížené ropnými uhlovodíky

Szostková M. (1), Horáková D. (2)

(1) Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; (2) Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Tvrdého 14, 602 00 Brno

Mikrobiální aktivita v půdách zatížených ropnými uhlovodíky byla sledována po dobu osmi týdnů. Všechny vzorky vykazovaly relativně vysokou aktivitu půdních mikroorganismů vyjádřenou jejich respirací a množstvím vytvořené biomasy. Byl stanoven úbytek jednotlivých frakcí ropných uhlovodíků. Přídavek nitrátů a fosfátů vedl ke zvýšení bazální respirace ve všech hodnocených vzorcích. Porovnávána byla mikrobiální aktivita vzorků odebraných z přirozeného kontaminovaného prostředí se vzorky uměle kontaminovanými v laboratoři. Poděkování: Příspěvek byl zpracován s podporou Výzkumného záměru č. MSM6215648905 „Biologické a technologické aspekty udržitelnosti řízených ekosystémů a jejich adaptace na změnu klimatu“ uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Enzymatic biotransformation of heterocyclic nitriles

Šveda O., Vejvoda V., Kaplan O., Křen V., Martínková L.

Centre of Biocatalysis and Biotransformation, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Heterocyclic amides and acids are valuable compounds with pharmaceutical and nutritional applications or intermediates of other fine and pharmaceutical chemicals. Nitriles can serve as readily available starting materials for the synthesis of these amides and acids, which, however, are often sensitive to harsh reaction conditions of nitrile hydration or hydrolysis. Therefore, enzymatic conversion is an alternative. In this work, we compare their usefulness for heterocyclic nitrile biotransformation with that of previously reported biocatalysts. New fungal „aromatic“ nitrilases accept some heterocyclic nitriles (3- and 4-cyanopyridine) as superior substrates and convert them into the corresponding acids. The benefits of these enzymes in comparison to most known nitrilases are their high specific activities and good thermal stabilities. For the preparation of amides from cyanopyridines, the nitrile hydratase from *R. erythropolis* A4 proved to be an enzyme of choice. Using whole cells of this organism, the corresponding carboxylic acids could be also obtained. Different formulations of both nitrilases and nitrile hydratases were prepared, based either on whole cells or (semi)purified enzyme. For instance, nitrilases and nitrile hydratases were immobilized on columns with Q- and Phenyl Sepharose to provide continuous bioreactors, which were used for biotransformations of heterocyclic nitriles. IAA 500200708, 203/05/2267, LC06010, AV0Z50200510

Effect of additional compounds on poly (vinylalcohol) biodegradation

Václavková T., Růžička J., Koutný M., Zeman P.

*Ústav technologie životního prostředí a chemie, Universita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. TGM 275, 762 72, Zlín*

Presented study was focused on poly (vinylalcohol) (PVA) biodegradation in a system including other available carbon/energy sources (tryptone and sucrose). Unacclimated activated sludge was used during initial biodegradation experiments. Results showed relatively rapid polymer degradation that occurred if PVA was present as the only carbon substrate, whereas degradation of PVA was markedly suppressed in the presence of tryptone and sucrose. No acceleration was found when putative specific growth factors (pyrroloquinoline quinone, secondary alcohols) were added. PVA degrading bacterium designated Ž1 was subsequently isolated from the employed activated sludge. The strain along with other two previously isolated PVA degrading bacteria OT2 and JK2 was then further investigated as pure cultures. It was observed that all three bacteria were able to utilize tryptone for their growth while sucrose was not utilized. The final tests were aimed at the explanation of inhibitory effect of tryptone and sucrose on PVA biodegradation. Because of the facts, that PVA degradation by the sludge enriched with Ž1 culture in the presence of tryptone proceeded successfully and, by contrast, the inhibition of PVA degradation was observed in the presence of sucrose, it could be concluded that prevalence of other heterotrophic microorganisms could prevent growth of PVA degrading bacteria.

A new effective nitrile-hydrolyzing strain *Fusarium solani* O1

Vejvoda V. (1), Kaplan O. (1), Malandra A. (1,2), Cantarella M. (2), Křen V. (1), Martínková L. (1)

(1)Centre of Biocatalysis and Biotransformation, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4, Czech Republic;
(2)Department of Chemistry, Chemical Engineering and Materials, University of L'Aquila, Monteluco di Roio, 67040, L'Aquila, Italy

A new nitrilase producer was obtained by selection on a medium containing 3-cyanopyridine as sole N source. This new soil isolate was identified as *Fusarium solani* O1 (CCF 3635). The activity was induced by 2-cyanopyridine, as a new nitrilase inducer (Kaplan et al., 2006); in cultivation on Czapek-Dox medium the total nitrilase yield was approximately 400 U.L⁻¹. Later on, by using the two-step cultivation, the yield of nitrilase activity was increased to 3000 U.L⁻¹. Its best substrates were 4-cyanopyridine (203 U.mg⁻¹protein) and benzonitrile (156 U.mg⁻¹protein). Molecular weight of the nitrilase subunit estimated by SDS-PAGE (40 kDa) and native molecular weight of the holoenzyme determined by gel filtration (580 kDa) suggested multimeric structure of this enzyme, which is in agreement with findings on other nitrilases. The enzyme showed a very good stability. Lyophilized mycelium did not lose any activity when stored at -20 °C for half a year. The purified nitrilase showed good stability in presence of 50% of hexane or heptane or in 15% of ethanol, retaining more than 50 % of its activity. The nitrilase optimum was between 40 and 45 °C, but thermal stability was 10-times higher at 35 °C in comparison with 45 °C. A significant benefit of the enzyme is chemoselectivity (production of nearly pure carboxylic acids from nitriles) and potential biotechnological applications. Financial supports: IAA 500200708, 203/05/2267, AV0Z50200510.

Webová a interní podoba databáze sbírky mikroorganismů CNCTC

Španělová P. (1), Jakubů V. (1), Adámková V. (2), Kolínská R. (1) a Žemličková H. (1)

(1) *Česná národní sbírka typových kultur (CNCTC), Státní zdravotní ústav - CEM, Šrobárova 48, Praha 10, 10042;* (2) - *Karlova Univerzita, 3.lékařská fakulta*

Zadáním bylo vytvořit systém, který zajistí povolaným pracovníkům kompletní správu sbírky kultur a současně umožní zákazníkům prostřednictvím webové stránky rychlou a snadnou orientaci ve všech produktech sbírky. Všechna data jsou uložena v databázi MySQL šířeného jako Open source. MySQL je relační databázový systém typu DBMS (database management system), jehož databáze jsou tvořeny jednou nebo více tabulkami. Práce s tabulkami a daty se provádí pomocí příkazů a dotazů, které vycházejí s programovacího jazyka SQL (Structured Query Language). Pro webovou prezentaci CNCTC (<http://www.szu.cz/cnctc/uvod.php>) se pomocí skriptovacího jazyka PHP využívají data uložená v databázi. Jádrem systému je databáze tvořená cca 21 propojenými tabulkami. Na zadávání a vyhodnocování dat byl použit program Microsoft Access umožňující snadnou tvorbu různě provázaných formulářů a dotazů. Snaha o maximální utřídění všech informací byla využita při vytváření on-line katalogu. Určitý kmen nebo kmeny lze najít za pomoci vyhledávání nebo procházením abecedního seznamu rodů a druhů. Všechny tyto seznamy a popisy jsou dynamické, tj. při každém načtení stránky se vytváří nová verze podle aktuálních dat. Aplikací databázového systému MySQL byl vytvořen katalog CNCTC sloužící pro vnitřní správu sbírky kultur, který je zároveň i podkladem interaktivní webové stránky CNCTC. Využití databáze výrazně usnadnilo veškerou administrativu spojenou s managementem sbírky kultur.

Studium biodiverzity hub v Sběrce kultur hub a MBÚ AVČR a další využití získaných kmenů

Kolařík M. (1, 2), Kubátová M. (2), Hujsová M. (2), Pažoutová S. (1), Flieger M. (1)

(1) Mikrobiologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 14220, Praha 4, Česká republika; (2) katedra Botaniky, PřF UK v Praze, Benátská 2, 12801, Praha 2, Česká republika

Z předpokládaného 1.5 milionu hub známe asi desetinu. Řada hub tedy čeká na své objevení a příroda skrývá další možné producenty látek využitelných člověkem. Sběrka kultur hub (CCF, součástí katedry botaniky PřF UK) a Mikrobiologický ústav AVČR spolupracují na poznání diverzity hub v opomíjených substrátech, typických přítomností řady nepopsaných druhů. V současné době jsou takto mimo jiné sledovány houby asociované s kůrovci a piložítkami, endofyti jilmu, houby extrémních půd a námlovití paraziti rostlin. Houby jsou nejdříve izolovány do čistých kultur, které jsou následně sjednoceny dle morfologie do skupin jejichž genetická homogenita je ověřena metodou RAPD. Zástupci každé skupiny jsou poté charakterizováni sekvencí některého z genů. Na závěr jsou genetická i morfologická data porovnána s publikovanými druhy. Zajímavé a nové druhy hub jsou uchovávány v CCF a jsou cíleně poskytovány k taxonomickým analýzám (zejména rod *Geosmithia* a *Penicillium*) či k analýze extrolytů (zejména *Geosmithia*, *Quambalaria*).

Novinky v nabídce kontrolních kmenů České sbírky mikroorganismů

Laichmanová M.

CCM, Ústav experimentální biologie, PřF MU, Tvrděho 14, 602 00 Brno, tel: 549 491 430, fax: 543 247 339, e-mail: ccm@sci.muni.cz

Nedílnou součástí kontroly kvality práce v mikrobiologických laboratořích je používání referenčních materiálů. Česká sbírka mikroorganismů (CCM) jako specializované servisní pracoviště Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity poskytuje mikrobiologickým laboratořím vybranou skupinu testovacích mikroorganismů pro účely kontroly diagnostických souprav a testů, pro ověření kvality kultivačních médií specifikovaných v normách kontroly jakosti vod a potravin, kontrolní kmeny pro stanovení citlivosti bakterií a kvasinek k antimikrobiálním látkám, kontrolní kmeny dle Českého lékopisu 2005 a kmeny pro testování inhibičních látek v potravinách. Jedná se o soubor 157 kmenů mikroorganismů dodávaných ve formě lyofilizátů nebo na želatinových discích. Nabídka CCM se v roce 2007 rozšířila o kontrolní kmeny pro účely interní kontroly kvality diagnostických souprav STAPHYtest 24 a CANDIDAtest 21. Pro řízení a prověřování kvality práce mikrobiologických laboratořích se zavedeným systémem jakosti nabízí CCM referenční materiály s definovaným počtem testovacích mikroorganismů. Jedná se o skupinu kontrolních kmenů ve formě želatinových disků s definovanou hodnotou CFU. Tyto disky jsou určeny pro interní i externí kontrolu kvality v laboratořích (kontrola kvality kultivačních médií a diagnostických metod pomocí regulačních diagramů). Informace o způsobu objednávání a distribuce těchto kmenů naleznete na internetových stránkách CCM www.sci.muni.cz/ccm/.

National Programme of Protection of Genetic Resources of Economically Significant Microorganisms and Tiny Animals

Novotný D. (1), Polák J. (2)

(1) Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Odbor rostlinolékařství, Oddělení mykologie, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, novotny@vurv.cz;

(2) Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Odbor rostlinolékařství, Oddělení virologie, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, polak@vurv.cz

“National Programme of Protection of Genetic Resources of Economically Significant Microorganisms and Tiny Animals” was established in 1996. The lawfull support of the Program is the “Law 148/2003 (Law on preservation and exploitation of the genetic resources of plants and microorganisms and on modification of the law 368/1992 statute book, on tariffs in wording of late rules (law on genetics resources of plants and microorganisms)”. The main organ is “Board of the genetic resources microorganisms and small animals of the economic importance of the Czech Republic (RGZM)” which mostly meet once a year. The goal of the program is collect, keep and provide the microorganisms (fungi, bacteria, viruses etc.) which are important for agriculture, including agricultural research. At present time 18 culture collections from ten research institutions and two universities take part in the national program. Ten collections keep fungi and fungal organisms, six collections keep bacteria, six collections keep viruses and virus like organisms, two collections keep invertebrates and one collection keep algae and blue algae. The list of strains and species (incl. the most important information) holds in collection participating in the program are accessible on web page www.vurv.cz/collections/vurv.exe/search?lang=cz The project is supported by Ministry of Agricultural the Czech Republic (no. 10/2006-2199St)

Polyfázová identifikace nokardií

Scharfen J. (1), Bunčec M. (2), Urbášková P. (3), Krejčí, E. (4)

(1) Národní referenční laboratoř pro patogenní aktinomycety, Oddělení lékařské mikrobiologie a imunologie, Oblastní nemocnice Trutnov, Gorkého 8, 541 01 Trutnov; (2) Generi Biotech, a.s. Hradec Králové (3) Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav Praha (4) Zdravotní ústav, Ostrava

Na konkrétních případech identifikace kmenů zasílaných do NRL pro patogenní aktinomycety v Trutnově ukázány možnosti identifikace pomocí fenotypových (morfologické, biochemické metody, fenotypy rezistence nokardií na antibiotika), chemotaxonomických (analýza mastných kyselin) a genotypových metod (sekvenace 16S rRNA genu, sekvenace ITS, sekvenace rpoB). Možnosti polyfázové taxonomie ověřeny pomocí mezinárodní studie na sbírkových kmenech nokardií uložených ve sbírce kultur v Trutnově (CCTR - Culture Collection Trutnov) existující při NRL pro patogenní aktinomycety.

Species identification of *Citrobacter* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Žemličková H. (1), Dřevínek M. (2), Kolínská R. (1), Placáková H. (2)

(1) *Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic* (2) *National Institute for Nuclear, Biological and Chemical Protection, Příbram – Kamenná, Czech Republic*

OBJECTIVES The *Citrobacter* species strains deposited in CNCTC originally isolated from clinical samples have been analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **MATERIALS AND METHODS** The *Citrobacter* species strains (146) previously identified by their biochemical reactions and deposited to CNCTC as *C. amalonaticus* (21), *C. koseri* (14), *C. freundii* (106), and *C. sedlakii* (5) were cultivated on nutrient agar under aerobic conditions for 18 hours. Eleventh described type strains of genus *Citrobacter* were included as standards. The samples were analyzed on a Bruker Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer in linear mode with pulsed ion extraction. The biomarkers were identified using FlexAnalysis software after data smoothing, baseline correction and peak picking. **RESULTS** MALDI-TOF MS allowed clearly identified 82% (120) of isolates. The following species of genus *Citrobacter* were identified: *C. amalonaticus* (12), *C. braakii* (21), *C. farmeri* (2), *C. freundii* (3), *C. gillenbergii* (6), *C. koseri* (14), *C. sedlakii* (3), *C. werkmanii* (9), and *C. youngae* (45). Five strains did not belong to genus *Citrobacter* and have been previously identified incorrectly. The results of 26 strains were unconvincing and identification to the species level was not possible. **CONCLUSION** MALDI-TOF MS is a simple, rapid, and affordable method which allows identification to the species level of major part of *Citrobacter* species strains

Sbírka kultur půdních aktinomycetů pro účely vyhledávání nejen polyketidových antibiotik manumycinového typu

Křišťátek V. (1), Chroňáková A. (1, 2), Petrásek J. (1), Elhottová D. (1), Beníšková P. (1), Hudecová I. (3)

(1) Biologické centrum AV ČR, v. v. i. - Ústav půdní biologie, České Budějovice, Česká republika; (2) Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, České Budějovice, Česká republika; (3) Poľnohospodárska univerzita, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Nitra, Slovenská republika

V Ústavu půdní biologie vzniká od roku 2006 sbírka kultur půdních aktinomycetů prvotně určená k identifikaci a izolaci potenciálních producentů sekundárních metabolitů s antibiickými, protizánětlivými a anti-apoptickými účinky. Předpokládá se, že sbírka bude obsahovat řádově stovky půdních (environmentálních) izolátů aktinomycetů. Sbírka bude pro každý izolát obsahovat podrobné informace o lokalitě odkud byl kmen získán, způsobu jeho izolace, fenotypovém vzhledu, růstových charakteristikách, citlivosti k antibiotikům a výsledcích jeho typizace pomocí box-PCR, 16S rDNA-RFLP, případně chemotaxonomickou analýzou FAME (to by mělo zabránit uložení dvou totožných kultur do sbírky). V současné době obsahuje sbírka 539 kultur aktinomycetů, které byly izolovány z půd a substrátů různých ekosystémů: zimní a horské pastviny, komposty, substráty výsypkových materiálů při těžbě hnědého uhlí, ledovcové předpolí, jeskynní, miocénní a městské sedimenty, těla uhynulých včel a exkrementy žížal. Kultury aktinomycetů jsou zatím uchovávány v glycerolových konzervách při -76 °C, postupně jsou převáděny do lyofilizované formy. Sbírka bude kromě cenných informací o biodiverzitě mikrobiálních společenstev v různých půdách / substrátech představovat velký biosyntetický potenciál uchovaných kmenů, ve smyslu tvorby sekundárních metabolitů, případně extracelulárních enzymů. Jako taková může být v budoucnu použita pro různé formy screeningu na produkci zajímavých bioaktivních látek a enzymů.

Sbírka zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) - 45 let od založení

Prodělalová J., Reichelová M., Dvořáková H., Valíček L.

*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Sbírka zoopatogenních mikroorganismů,
Hudcova 70, 621 00 Brno, Česká republika*

Sbírka zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) byla založena 25. září 1962 jako Veterinární sbírka mikroorganismů na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. V současné době je součástí Oddělení bakteriologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i., v Brně. Sbírka je zaměřena na získávání, uchovávání a poskytování živočišných virů a zoopatogenních bakterií. Sbírka je členem Světové federace sbírek kultur (WFCC), Organizace evropských sbírek kultur (ECCO) a Federace československých sbírek mikroorganismů (FCCM). Sbírka uchovává mimo 318 katalogizovaných kmenů virů a 595 kmenů bakterií ještě 223 virových a 646 bakteriálních izolátů. Celkem tedy uchovává 1782 kmenů a izolátů. Mikroorganismy jsou uchovávány v tekutém dusíku, při -80 °C a lyofilizované. Od roku 2005 má sbírka k dispozici zabezpečenou laboratoř (BSL3) pro práci s nebezpečnými patogeny. Bakterie a viry jsou poskytovány pro potřeby veterinární praxe, diagnostiky, výzkumu, výuky, farmaceutického průmyslu a biotechnologie.

Toll like receptors 1, 2 and 4: possible markers of natural resistance against mastitis?

Bhide MR. (1), Swiderek WP. (2), Gruszczynska J. (2), Mucha R. (1), Mikula I. jr. (1), Kisova L. (1), Witkowska D. (2), Mikula I. sr. (1)

(1) Laboratory of Biomedical Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine Komenskeho 73 Kosice, Slovakia mail. mangeshbhide@hotmail.com; (2) Department of Genetics and Animal Breeding, Warsaw Agricultural University- SGGW, Warsaw, Poland.

Correlation between Toll like receptor (TLR) gene mutations and susceptibility of udder to bacterial infections in sheep in Polish Lowland Sheep (PLS), and Polish Heath Sheep (PHS) is described. Sheep were subjected to close inspection of udder health, somatic cell count and TLR1, 2, and 4 gene mutations. Ovine genomic DNA was used for PCR to amplify fragments of targeted genes, then subjected to SSCP for mutation detection and SNPs were confirmed by DNA sequencing. We recorded 2 alleles of TLR1, 6 alleles of TLR2 and 10 alleles of TLR4 genes in PHS sheep, whereas, in PLS sheep, we found 2, 4 and 6 alleles respectively. Sheep carrying TLR1_2 (TLR1 allele number 2) and TLR2_2 alleles were free of pathogens in their milk, thus were naturally resistant for mastitis (preventive factor). Whereas, PHS carrying TLR2_4 allele and PLS carrying TLR2_1 allele were more prone for bacterial infection of udder (risk factor). Amongst TLR4 alleles, TLR4_3 allele was calculated as preventive factor (OR – 0.375) against bacterial infection in PHS. The mentioned results may be an evidence of differentiated predispositions product of the specified alleles to recognise properly pathogen and initiate the effective immunological response. It creates the possibility of identifying the markers of natural resistance in ewes against mastitis.

Interaction between alternative complement pathway and bacterial pathogens: special reference to borreliae and streptococci

Bhide MR. (1), Anda P. (2), Escudero R. (2), Kisova L. (1), Mikula I.jr. (1), Mucha R. (1), Kovacsova K. (1), Mikula I.sr. (1)

(1) Laboratory of Biomedical Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine Komenskeho 73 Kosice, Slovakia mail. mangeshbhide@hotmail.com; (2) Laboratory of Special pathogens Institute of Health, Carlos III Majadahonda, Madrid Spain

Alternative Complement pathway is one of the major innate immune mechanisms against pathogens. Some bacterial pathogens, like borreliae and streptococci have developed complement blocking mechanism through binding of factor H on their surface and thus degradation of C3. Hitherto, interaction between these pathogens and factor H of cattle and sheep has not assessed. We tested cattle and sheep factor H binding by borrelial (11 serotypes) and streptococci (group A) proteins. To test, bacterial whole cell proteins were transferred on nitrocellulose membrane, blotted against cattle and sheep complement, bound factor H was detected with conjugate-chemiluminescence system. Results showed that none of the *Borrelia* species except *B. coriacea* had cattle-factor H binding proteins (40 and 58 kD), whereas, all 11 *Borrelia* species except *B. japonica* and *B. andersonii* possessed various sheep-factor H binding proteins (20, 26, 24, 28, 40 and 58 kD). This indicates that only *B. coriacea* has defense proteins against cattle-complement killing, thus can survive and cause disease in cattle. *B. japonica* and *B. andersonii* can not survive in sheep blood, thus sheep is non-reservoir for these species. Interestingly Group A Streptococci (GAS) showed cattle-factor H binding proteins (58 kD), likely protein-M. However, this protein does not react with sheep-factor H. This indicates that GAS (*S. pyogenes*) block the complement mediated killing in cattle but not in sheep.

Výskyt izolátů *Escherichia coli* rezistentních k antimikrobiálním látkám a salmonel u havranů polních zimujících v České republice

Dolejská M. (1), Literák I. (1), Vanko R. (1), Čížek A. (2), Karpíšková R. (3)

(1) Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, (2) Ústav mikrobiologie a imunologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého 1-3, 612 42 Brno (3) Centrum hygieny potravinových řetězců v Brně, Státní zdravotní ústav, Palackého 3a, 612 42 Brno

Užívání antimikrobiálních látek u hospodářských zvířat a v humánní medicíně vede k selekci rezistentních bakterií, které se mohou prostřednictvím odpadních produktů šířit do prostředí a vytvářet nové rezervoáry ve volné přírodě. Bylo vyšetřeno 363 vzorků trusu havranů polních (*Corvus frugilegus*) zimujících v České republice pocházejících z populace v západní oblasti evropské části Ruska na přítomnost *Escherichia coli* rezistentních k antimikrobiálním látkám a salmonel. Rezistentní izoláty byly vyšetřeny na přítomnost genů antibiotické rezistence a integronů třídy 1 metodou PCR. Celkem 14 % izolátů *E. coli* bylo rezistentních k jedné nebo více z testovaných antimikrobiálních látek. Rezistence k tetracyklinu byla nejčastější, prokázána u 8 % izolátů. U 4 rezistentních izolátů byl prokázán integron třídy 1 o velikosti 1 kb s genovou kazetou *aadA1*. Salmonely byly prokázány v 9 (2 %) vzorcích a charakterizovány jako *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* PT8 (7) a PT23 (2). Naše výsledky ukazují, že ačkoliv se havrani polní přirozeně do kontaktu s antimikrobiálními látkami nedostávají, mohou být infikováni izoláty *E. coli* rezistentními k antimikrobiálním látkám. Izoláty pocházejí pravděpodobně ze zdrojů potravy a vody v prostředí. Tito migrující ptáci mohou sloužit jako případný vektor rezistentních *E. coli* a salmonel na dlouhé vzdálenosti. Řešeno s podporou grantu MSM6215712402.

Mutácie v génoch hostiteľa a mikrobiálna infekcia

Mikula I., Bhide M., Mikula I. jr

LBMI UVL, Košice

Sústavný súboj medzi hostiteľom a infekciami viedol počas „večného“ procesu evolúcie k neustálym zmenám v genetickej konformácii oboch sústav zastúpených patogénom a jeho hostiteľom. Zo strany patogéna dochádza k neustálemu napodobovaniu proteínov hostiteľa k premene a regulácii génov, ako aj k neustálym zmenám antigénnych štruktúr patogéna, čo mu umožňuje úspešne sa uplatniť v patogeneze. Na druhej strane si hostiteľ vytvoril početné obranné nástroje pre zaznamenanie útoku patogéna až na úrovni génov imunitného systému (MHC, TLR, NRAMPy, komplementu a pod.). Tento vysoký stupeň zaisťovaný mutáciami v génoch poskytuje širokú diverzitu v imunitnej odpovedi, v súťaži s patogénom o navodenie obrannej reakcie voči infekcii. Stáva sa, že i mutácia jedného nukleotidu v géne imunitného systému hostiteľa môže spôsobiť zmenu v obrane proti patogénom. Naše a iné výsledky potvrdili zvýšenú náchylnosť hostiteľa k infekciám spôsobených baktériami (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), streptokokmi, boréliami) a vírusmi (Maedi Visna, BHV), ak sú vnímavé jedince nositeľmi určitých SNP mutácie v jednom alebo viacerých génoch imunity. V práci sme sa zamerali na mutácie pri génoch MHC a TLR. Zaznamenali sme rôznorodosť patogénov rodov *Streptococcus*, MAP a borélie v schopnosti komunikácie s imunitným systémom.

Archaeal community of cattle digestive system

Němcová A. (1, 2), Elhottová D. (1), Gattinger A. (3)

(1) Biological Centre AS CR, Institute of Soil Biology, CZ-370 05, České Budějovice, Czech Republic, (2) Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, CZ-370 05 České Budějovice, Czech Republic, (3) GSF-National Research Centre for Environment & Health, Institute of Soil Ecology, D-85764 Neuherberg 10

A cattle breeding represents a significant anthropological source of methane as a contributor to the global warming. Methanogenic archaea inhabiting particularly cattle rumen and intestine are after wetland's methanogenes the second biggest biological sources of methane. To assess the size and composition of archaeal community in the digestive system of the grazing cattle we analyzed phospholipid-etherlipids (PLEL) obtained from the rumen juice and excrements by the modified method according to Gattinger (2003). The archaeal biomass contained in rumen juice and in excrements didn't differ significantly (71.31 ± 22.86 and 89.56 ± 37.08 nmol PLEL g⁻¹ dw, respectively) although its relative content represented in rumen juice 5.21 ± 2.35 % and in excrements only 0.87 ± 0.25 % of total microbial biomass. In both digestive environments were detected isoprenoids i20:0, i20:1, i40:0 whereas in rumen juice also i15:0 and i40:0-2cy appeared. These results supported the assumption that the all rumen archaea are not able to survive in severe anaerobic conditions of the other intestinal parts. The biomass of methanogens characterized by isoprenoid i20:1 counted in rumen juice 5.73 ± 0.50 % and in excrements 4.65 ± 1.86 % of total detected archaeal biomass which represented 0.05 ± 0.02 % and 0.24 ± 0.09 % of total microbial community. Methanogenic archaea originating in beef cattle digestive system play fundamental role in global carbon cycle although they are only minor part of complex community.

Multiplex PCR pro detailní charakteristiku *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Rychlík I., Hradecká H., Malcová M.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno, Česká republika

Salmonella enterica serovar Typhimurium je původce gastrointestinálních onemocnění člověka. Kmeny tohoto serovaru se mimo člověka vyskytují i u drůbeže, prasat a skotu, a tato hospodářská zvířata proto mohou být rezervoárem tohoto serovaru. Pro bližší charakterizaci kmenů *S. Typhimurium* při epidemiologických studiích se nejčastěji používá pulzní gelová elektroforéza (PFGE). Porovnání genomů různých kmenů serovaru Typhimurium pomocí microarray analýzy ukázalo, že nejčastějším zdrojem variability mezi kmeny jsou integrované profágy. Srovnáním kompletních genomových sekvence 3 kmenů *S. Typhimurium* jsme si dále potvrdili výsledky microarray analýzy a navíc jsme zjistili, že s jedinou výjimkou rozdílů v PFGE profilech přímo závisí na integrovaných profázích. Proto jsme navrhli 21 různých PCR specifických zejména na profágové sekvence a ty jsme otestovali na 50 kmenech. Z této sady bylo vybráno 12 PCR s největší rozlišovací schopností, pro které byly navrženy 4 triplex PCR a ověřeny na 102 terénních kmenech zároveň s PFGE. Mezi těmito kmeny bylo nalezeno 22 různých multiplex PCR kombinací, kterým bylo přiřazeno jednoduché digitální kódování. Protože pomocí PFGE bylo ve stejné skupině kmenů identifikováno 25 různých typů, lze říci, že oba postupy mají srovnatelnou rozlišovací schopnost. Protože však časová náročnost a zpracování výsledků je v případě multiplex PCR jednoznačně jednodušší, tato metoda představuje zajímavou alternativu k typizaci pomocí PFGE.

Diagnostika salmonelových infekcí v chovech prasat sérologickým testem ELISA a kultivací

Šišák F. (1), Havlíčková H. (1), Pospíšilová M. (2), Karpíšková R. (2)

(1) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 32 Brno, (2) Státní zdravotní ústav Praha, Centrum hygieny potravinových řetězců, Palackého 1/3, 612 42 Brno

Salmonelové infekce u prasat jejichž hlavními původci v České republice jsou sérovary Typhimurium a Derby se vyskytují nejčastěji v klinicky asymptomatické formě. Významnou úlohu při šíření nákazy mají bacilonosiči, zpravidla prasnice, od nichž se selata infikují salmonelami. V naší studii byl sérologickým testem ELISA a kultivačním vyšetřením zjištěn výskyt salmonelových infekcí v sedmi chovech prasnic v období před odstavením selat. Vzorky trusu byly vyšetřeny standardním postupem EN ISO 6579:2002. Izolované kmeny byly po sérotypizaci vyšetřeny diskovou difúzní metodou na citlivost ke 14 antibiotikům (NCCLS, 2002). Prevalence salmonel hodnocená na základě sérologického vyšetření a kultivace byla 17,8 % a 13,3 % v I. chovu, 20,0 % a 4,4 % v II. chovu, 40,0 % a 20,0 % ve III. chovu, 53,3 a 0 % ve IV. chovu, 86,7 a 8,9 % v V. chovu a 30,3 % a 0 % v VI. chovu a 62,2 % a 2,2 % v VII. chovu. Celkem bylo izolováno 22 kmenů *Salmonella* spp. zařazených do sérotypů Derby (n=17), London (n=2), Bredeney (n=1) a Goldcoast (n=1) a Typhimurium fágového typu DT104 (n=1). Pouze u tohoto jediného izolátu *S. Typhimurium* byl zjištěn pentarezistentní fenotyp ACSSuT; ostatní izolované kmeny salmonel byly citlivé k testovaným antibiotikům. Nebyla zjištěna korelace mezi séroprevalencí v testu ELISA a pozitivní kultivací ve vyšetřovaných chovech prasnic. Práce byla podporována granty OC NA.001MŠMT ČR a MZE0002716201.

Výskyt antibiotické rezistence u sérovarů *Salmonella* spp. izolovaných z aviárních zdrojů

Havlíčková H. (1), Šišák F. (1), Hradecká H. (1), Rychlík I. (1), Karpíšková R. (2)

(1) *Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 32 Brno*, (2) *Státní zdravotní ústav Praha, Centrum hygieny potravinových řetězců, Palackého 1/3, 612 42 Brno*

U 204 aviárních izolátů salmonel 14 sérovarů byla pomocí diskové difúzní metody (NCCLS, 2002) hodnocena citlivost k antibiotikům. Největší výskyt rezistentních kmenů byl u krůt (81,8 %), holubů (81,3 %) a kura domácího – *Gallus gallus* (18,5 %). Výskyt rezistence byl nejčastěji zjištěn v sérovaru Typhimurium (n=77), jehož kmeny byly nejčastěji rezistentní ke streptomycinu, sulfonamidům, tetracyklinu, chloramfenikolu a ampicilinu; rovněž byla zjištěna rezistence ke fluorochinolonům, nejčastěji ke kyselině nalidixové. Největší výskyt multirezistentních kmenů (MR) dominantního fagotypu DT104 byl zjištěn u krůt a kura. K prevalentním fenotypům ACSSuT a ACSSuT NA byly přidruženy rezistence ke gentamicinu, amoxicilinu, enrofloxacinu, sulfametoxazol/trimetoprimu a neomycinu. Rozdílné typy multirezistencí byly dále zjištěny u sérovarů Saintpaul, Zanzibar a Diego. Izoláty sérovarů Enteritidis, Agona, Infantis, California a Lille byly monorezistentní k různým antibiotikům. Přítomnost integronů a genů rezistence byla zjištěna pomocí specifických PCR u 26 kmenů fagotypu DT104 z celkového počtu 32 testovaných izolátů *S. Typhimurium*. Rozdílné výsledky v průkazu integronu a genů rezistence, které odpovídaly příslušnému fenotypu byly zjištěny u kmenů fagotypů U, DT1, DT10 a RDNC. Práce byla podporována granty MZE0002716201 a 1B44019 MZE-NPV.

Použitie metódy FISH pri stanovení baktérií tráviaceho traktu kojencov a mláďat prežúvavcov.

Šmehilová M., Tománková E., Rada V.

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha - 6 Suchbátar

Stanovenie baktérií kultivačne je často nepresné, časovo náročné a výsledky môžu byť skreslené. Cieľom práce bolo aplikovať metódu FISH pri stanovení počtov baktérií tráviaceho traktu kojencov a mláďat prežúvavcov. Testovaných bolo 74 vzorkov stolice kojencov, 75 vzorkov výkalov jahniat a vzorky výkalov a častí tráviaceho traktu 20 teliat. Pre stanovenie počtu hlavných skupín baktérií tráviaceho traktu bol použitý FISH kit a selektívne kultivačné médiá. Rozdiely počtu baktérií kojencov stanovené kultiváciou a FISH neboli štatisticky významné. U jahniat boli zaznamenané signifikantne vyššie počty bifidobaktérií a *E. coli* kultivačnou metódou, avšak rozdiely boli spôsobené neúplnou selektivitou agarov. FISH boli stanovené signifikantne vyššie počty laktobacilov. U ďalších sledovaných skupín baktérií neboli zaznamenané rozdiely. Signifikantné boli aj rozdiely v stanovení laktobacilov teliat, vyššie počty boli zaznamenané pomocou FISH. Ostatné stanovenia boli štatisticky nevýznamné. Najväčšiu koncentráciu baktérií sme zaznamenali v bachore, slepom a hrubom čreve. Bifidobaktérie slezu a tenkého čreva nebolo možné pomocou FISH stanoviť, ich počty boli nižšie ako detekčný limit (106 KTJ) metódy. Počty kultivačne stanovených bifidobaktérií v týchto častiach traktu boli nižšie než výsledky FISH. Možno konštatovať, že metódu FISH je možné aplikovať pri detekcii baktérií tráviaceho traktu ľudí aj prežúvavcov. Práca bola sponzorovaná grantami MSM 6046070901 a GAČR 523/03/ H076.

Produkce termolabilního enterotoxinu enterotoxigenními kmeny *E. coli* ze selat

Alexa P., Hamřík J., Konstantinova L., Zajacová Z.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno

Enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli* (ETEC) vyvolávají průjmová onemocnění selat sajících a po odstavu. Ze selat trpících průjmy po odstavu jsou velmi často izolovány ETEC náležející k séro skupině O149:F4 (K88). Průjmové kolinfekce selat po odstavu vyvolávají i jiné typy ETEC, a při pitvě u uhynulých selat nebývají pozorovány zánětlivé změny na střevech. V případě, že je při pitvě selat uhynulých po odstavu zjištěn silný zánět střev, pokud jsou jako příčina detekovány ETEC, jedná se prakticky výhradně o skupinu O149:F4. Cílem naší práce bylo zjistit, zda se od sebe liší kmeny O149:F4 od jiných typů produkujících termolabilní enterotoxin (LT) v množství produkovaného toxinu, případně v reakci na přídavek lincomycinu do kultivačního média. ETEC O149:F4 (n=132) a ETEC jiných séro skupin (n=91) byly kultivovány v tekutém médiu podle Evanse a množství LT bylo semikvantitativně detekováno titrací na buněčné linii Y1. Každý kmen byl kultivován v médiu bez antibiotik a s přídavkem lincomycinu (100mg/l). Median titrů LT kmenů ETEC O149:F4 byl 10 v supernatantech bez lincomycinu a 40 v supernatantech s lincomycinem. V supernatantech ETEC jiných séro skupin byl median titrů bez lincomycinu 160 oproti titru 320 s lincomycinem. Bez stimulace produkce LT lincomycinem dosáhly vyššího titru LT než 40 jen 3 kmeny ETEC O149:F4, zatímco z ETEC jiných séro skupin dosáhlo titru LT nad 160 více než 50% kmenů (46). Práce vznikla za podpory projektu 1B44020.

Využitie Etestu na stanovenie citlivosti *Malassezia pachydermatis*

Čonková E., Vantrubová J., Čellárová E., Šutiak V.

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Ústav farmácie a farmakológie, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

Malassezia pachydermatis, komenzálna lipolitická kvasinka, ako oportúnny patogén je často izolovaná z vonkajšieho ušného kanála a kože psov a mačiek pri otitídach a dermatitídach. Stanovenie citlivosti patogénneho kmeňa voči testovaným antifungálnym látkam umožňuje cieľnú terapiu a zároveň znižuje nebezpečenstvo vzniku rezistencie. Predmetom prezentovanej práce bolo vyhodnotiť citlivosť 22 izolátov *Malassezia pachydermatis* na vybrané antimykotiká pomocou Etestu. Najvyššiu antimykotickú aktivitu vykazoval itrakonazol, ktorého hodnoty MIC boli v rozpätí 0,002-0,125 $\mu\text{g/ml}$ (modus (M) = 0,006 $\mu\text{g/ml}$). Malasézie boli citlivé aj na ketokonazol s MIC od 0,003-0,25 $\mu\text{g/ml}$ (M=0,006 $\mu\text{g/ml}$) a flukonazol s MIC od 1-32 $\mu\text{g/ml}$ (M=8 $\mu\text{g/ml}$). Z novších azolových molekúl bol posakonazol (MIC od 0,012-0,38 $\mu\text{g/ml}$; M=,012 $\mu\text{g/ml}$) účinnejší ako vorikonazol (MIC od 0,5-2 $\mu\text{g/ml}$; M=0,5 $\mu\text{g/ml}$). Neazolová zlúčenina amfotericín bola najmenej efektívna (MIC od 0,125-0,5 $\mu\text{g/ml}$; M=0,19 $\mu\text{g/ml}$). Nakoľko v súčasnosti nie sú vypracované interpretačné kritéria hodnotenia citlivosti testovanej kvasinky, jej citlivosť bola posúdená na základe štatistických údajov.

Prevalencia protilátok proti *Coxiella burnetii* u študentov UVL v Košiciach, Slovensko

Dorko E. (1), Kalinová Z. (1), Weisssová T. (2)

(1) Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 041 80 Košice, Slovensko; (2) I. Interná klinika, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovensko

Q horúčka je infekčné ochorenie zapríčinené striktným intracelulárnym parazitom *Coxiella burnetii*. Najčastejšími rezervoármi tejto zoonózy sú hovädzí dobytok, ovce a kozy. Človek sa infikuje inhaláciou kontaminovaného aerosolu, alebo konzumáciou kontaminovaných mliečnych výrobkov. Prenos kliešťami je tiež dokázaný, ale je pravdepodobne zriedkavý. V tejto práci sme študovali séroprevalenciu a rizikové faktory asociované s infekciou *C. burnetii* u študentov veterinárskeho lekárstva. Rizikové faktory asociované s infekciou *C. burnetii* boli odborná prax pri kontrole a spracúvaní potravín a v živočíšnej výrobe, kontakt so zvieratami, hlavne prežívavcami a častý kontakt s osobami, ktoré pracujú so zvieratami (veterinári, farmári). Mnohí študenti chovajú doma psov, mačky, aj hlodavcov. Študenti uviedli v dotazníku z klinických príznakov pretrvávajúcu horúčku neznámej etiológie, reumatické ochorenia, ochorenia kardiovaskulárneho systému, ochorenia pečene, atypickú pneumóniu, chronickú únavu atď. Protilátky proti antigénu fázy II *C. burnetii* sme vyšetřovali ELISA metódou. Titer protilátok 1:100 sme detekovali u 19 študentov, 1:200 u 28, 1:400 u 14 a 1:800 u troch študentov. Najvyšší titer 1:3200 sme stanovili u študentky, ktorá sa sťažovala na pretrvávajúce zdravotné problémy a v minulosti prekonala infekčnú mononukleózu. Z celkového počtu vyšetřených študentov (n=79) negatívny výsledok sa zistil v 14 prípadoch.

Výskyt koxielózy u kôz na východnom Slovensku

Kalinová Z. (1), Dorko E. (1), Trávníček M. (2)

(1) Ústav epidemiológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 041 80 Košice, Slovenská republika; (2) Ústav epizootológie a infekčných chorôb, Univerzita veterinárskeho lekárstva Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

Q horúčka je zoonóza zapríčinená obligátnym intracelulárnym parazitom *Coxiella burnetii*. Ochorenie je rozšírené celosvetovo, okrem Nového Zélandu. Infikované hospodárske zvieratá (hovädzí dobytok, ovce, kozy), ale aj domáci miláčikovia (mačky a psy) sú hlavným zdrojom infekcie u ľudí. Infekcia u zvierat prebieha väčšinou asymptomaticky, alebo môže spôsobovať potraty a narodenie mŕtveho plodu. Infikované samice vylučujú koxiely do prostredia počas pôrodu pôrodnými tekutinami a placentou. Človek sa najčastejšie nakazí vdýchnutím kontaminovaného aerosólu, menej často alimentárnou cestou (konzumácia nepasterizovaného mlieka a mliečnych výrobkov). V našej štúdií sme zisťovali prítomnosť protilátok proti antigénu fázy II *C. burnetii* u kôz. Vyšetrených bolo 93 vzoriek sér ELISA metódou. Za pozitívne sa považovali titre ≥ 800 . Najvyšší titer 1:25600 bol zistený u 4 kôz. Titre 1:12800 u 2, 1:6400 u 8, 1:3200 u 3, 1:1600 u 5, 1:800 u 11, 1:400 u 11, 1:200 u 12 a 1:100 u 5 kôz. Protilátky sa nezistili v 32 prípadoch.

Porovnávacie štúdiá expresie faktor H viažucich Erp25 a Erp26 proteínov Borrelie garinii a B. bissettii u oviec, kráľíka a človeka

Kišová L. (1), Bhide M. (1), Filipčík P. (2), Mikula I. (1), Mucha F. (1), Mikula I. jr. (1)

(1) *Univerzita Veterinárskeho Lekárstva, LBMI, Komenského 73, 041 81 Košice;*
(2) *Neuroimunologický Ústav, SAV, Bratislava*

Pôvodcom ochorenia Lymfatickej boreliózy je komplex baktérii *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Tie sa udržujú v prírode kolobehom medzi kliešťami a teplotnými stavovcami. Pri vzniku infekcie u hostiteľov *Borrelie* regulujú expresiu viacerých génov a následne proteínov. Medzi povrchové proteíny ktoré sú expresované počas infekcie zvierat a ľudí patria OspE a Erp lipoproteíny. Tieto proteíny viažu faktor H komplementového systému, zablokujú komplementovú kaskádu a vyhnú sa pôsobeniu vrodenej imunitnej odpovedi. Prezentujeme expresiu Erp proteínov, Erp25 a Erp26. *B. garinii* zvyčajne netvorí faktor H viažuce proteíny počas infekcie u ľudí a preto napadá nervový systém. V našej práci *B. garinii* (SKT1, serotype 6) neexpresovala mRNA Erp25 a Erp26 keď bola inkubovaná s králičím, ľudským a ovčím komplementom. Avšak značná expresia týchto génov bola pozorovaná pri kmeni *B. bissettii*. Pre túto analýzu boli inkubované baktérie v lag fáze s komplementom 6 dní pri 33°C, následne bola izolovaná RNA a expresia mRNA bola vyhodnotená pomocou reverznej transkriptázy-real time PCR. Výsledky potvrdia, že *B. garinii* serotype 6 nemá obranné mechanizmy voči komplementom sprostredkovanému zabitíu. A preto ovce a králik nemôžu slúžiť ako rezervoár pre *B. garinii*. Avšak *B. bissettii*, ktorá vykazovala expresiu obranných proteínov môže uniknúť komplementom sprostredkovanému zabitíu a preto králik a ovca môžu byť rezervoárom pre *B. bissettii*. Taktiež *B. bissettii* môže vyvolávať boreliózu u človeka.

Bacteria and fungi in dogs with otitis externa

Lysková P., Mazurová J., Vydržalová M. a Vančatová I.

Univerzita Pardubice, Katedra biologických a biochemických věd, Štrossova 239, 530 03 Pardubice

The bacterial and fungal flora of dogs suffering with otitis externa was studied in order to determine the causative agents. The bacterium *Staphylococcus intermedius* (60.6 %) was the most frequently isolated microorganism from otitic ears, followed by *Malassezia pachydermatis* (30.9 %), *Streptococcus canis* (25.2 %), *Proteus* spp. (14.9 %) and *Escherichia coli* (10.2 %). A statistical analysis of our results showed that the prevalence of these microorganisms is significant in dogs with otitis externa. Furthermore, the antimicrobial susceptibility patterns of isolated strains were determined. Majority of all bacterial isolates were most susceptible to gentamicin. *M. pachydermatis*, the most prevalent yeast in this study, showed an excellent level of susceptibility to all antifungal agents tested. The study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Research Intention No. 0021627502).

Stanovení citlivosti bovinních izolátů *Mannheimia haemolytica* a *Pasteurella multocida* k tulatromycinu in vitro

Masaříková M., Smola J.

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav mikrobiologie a imunologie,
Palackého 1-3, Brno, 612 42*

Pro přesnou diagnostiku bakteriálních původců pneumonií telat a mladého skotu je zásadní intravitální odběr materiálu z dolních cest dýchacích, kde se nachází primární agens (*M.haemolytica*), ale i sekundární původci (*P.multocida*). Pro výsledek kultivačního vyšetření je velmi důležitý transport těchto vzorků v médiích jako je Cary-Blair, případně jiných, která udrží jinak vysoce citlivé mikroorganismy v původních počtech. Výsledkem této studie je průkaz citlivosti všech testovaných izolátů *M.haemolytica* a *P.multocida* z klinicky závažných případů pneumonií telat a jalovic k tulatromycinu diskovým difúzním testem. Izoláty, pocházející z období let 1999-2005, reprezentovaly celkem 27 různých farem skotu z celého území České republiky. U žádného z izolátů obou druhů jsme vyšetřením in vitro nezjistili fenotyp odpovídající rezistenci nebo intermediární citlivosti.

Analýza výskytu mutácií v TLR7 u plemien karpatského regiónu

Mikula I. jr., Bhide M.

UVL, Komenského 73, 041 81 Košice

Metódou SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) a následným sekvenovaním boli zisťované mutácie v géne TLR7 v LRR (Leucin-rich repeats) a TIR (Toll/interleukin-1 receptor) doménach na celkovom súbore 144 kráv plemien Červienka, Slovenský strakatý a Burok. V TIR doméne nebola zistená žiadna mutácia. V doméne LRR boli zistené mutácie v oblasti <497..>735 a "LRR_RI" (Leucine-rich repeats, ribonuclease inhibitor (RI)-like subfamily) 620..>760 (ABQ52582). Zmena bola zaznamenaná v pozícii 1932 C/G +vlákno a 1932 C/S +vlákno u všetkých troch plemien. Uvedené zmeny neboli doteraz popísané v tomto géne pri iných doteraz analyzovaných plemenách (Romangola, Piedmontese, Piedmontese, Holstein, Charolais, Braford, Angus) v Kanade (Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9 - E.J. Cargill 1, J.E. Womack). Zistené výsledky poukazujú na odlišnosti sekvencií TLR7 génu u plemien chovaných v karpatskom regióne.

Survey of structural genes for enterocin production among animal isolates

Strompfová V., Simonová M., Szabóová R., Haviarová M., Lauková A.

Institute of Animal Physiology Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia

Research on bacteriocins from lactic acid bacteria has expanded during the last decades, to include the use of bacteriocins or the producer organisms as natural food preservatives. Enterococci produce a variety of bacteriocins and wide differences in their inhibitory spectra among species and strains are depending on the presence of various combinations of structural genes and on their expression. In this study, occurrence of structural genes responsible for production of enterocins A, B, P, L50B was tested among 255 enterococci isolated from wild and domestic ruminants, dogs, goats, chickens, rabbits, horses, rodents and turkeys. The structural gene of enterocin A was most frequently detected (34.4 %), followed by gene of enterocin P (30.2 %), gene of enterocin L50B (23.5 %) and B (22.4 %). The most frequent occurrence of all structural genes tested was in enterococci isolated from horses, followed by wild ruminants and goats. The lowest occurrence of genes was found in enterococci isolated from rodents and turkeys. The combination of enterocins A, B, P and L50B genes was most frequent (28 strains), followed by the combination of enterocins A, P, L50B genes (20 strains) and the combination of enterocin P and B genes (11 strains). No structural genes were detected in 142 strains. On the basis of the results, a big variability exists in the presence of enterocins genes in strains from different animals. Work was funded by the project VEGA 2/5139/27.

Lactic acid bacteria and canine feed

Strompfová V., Lauková A., Simonová M., Marciňáková M., Štyriak I.

Institute of Animal Physiology Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia

Enterococci (22 strains) and lactobacilli (25 strains) isolated from different commercially available canine feeds were tested for their probiotic potential such as antibiotic sensitivity, adhesion, tolerance to bile, production of lactic acid and antimicrobial substances, urease activity, binding to extracellular matrix glycoproteins, and detection of structural genes for production of enterocins A, P, B, L50B in enterococcal isolates. Among 28 canine feeds, enterococci were detected in 12 feeds (42.8 %); their counts ranged from 10¹ up to 10³ CFU/g. Lactobacilli were isolated from 6 canine feeds and reached 7x10² CFU/g (range 10¹-10³). Four strains of lactobacilli were genotyped as *Lactobacillus fermentum*, 6 strains of enterococci were allotted to the species *Enterococcus faecium*, 4 strains to *E. faecalis* and 1 to *E. hirae*. At least one of the tested enterocins genes was detected in 10 strains of enterococci (gene for enterocin P was found most often). All strains survived in the presence of 5% oxgall-bile sufficiently. Enterococci showed ability to adhere to human and canine intestinal mucus in the range from 6.2 up to 7.5 log₁₀ cells. On the basis of results, the most promising strains - *L. fermentum* CHR2 and *E. faecium* EE3 were selected for utilization in the other experiments under in vitro and in vivo conditions as potential feed additive. This work was financially supported by the project VEGA 2/5139/27 of Slovak Scientific Agency.

Enterococci associated with rabbits meat

Szabóová R., Simonová M., Lauková A.

Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 040 01, Košice, Slovakia

Enterococci are Gram-positive facultative anaerobic bacteria belonging to the group of lactic acid bacteria; Devriese et al., 1993). The aim of this study was isolate, identify and characterize the population of enterococci obtained from back limb meat of rabbit. The strains were tested for lactic acid production, survival in the presence of bile and in pH 3 and sensitivity to antibiotics (kanamycin, streptomycin, tetracycline, rifampicin, chloramphenicol- 30 μ g; erythromycin- 15 μ g; gentamycin, ampicillin- 10 μ g; neomycin- 5 μ g) by the agar disc diffusion method, as well as they were genotyped by PCR and tested to produce bacteriocins (enterocin A, P, B, L50B). The isolation of enterococci was provided by using Kanamycin Esculin Azide agar (Biomark). Among 34 isolates specified by PCR, 14.7% of strains belonged to the species *Enterococcus faecium*. The ability of the tested strains to survive in broth with 1% oxgall (bile) varied between 38-97%; they survive in pH 3 ranged from 2.0 up to 5.9 log₁₀ cfu/ml. Lactic acid production of enterococci ranged from 0.74 up to 1.72 mmol/l and the majority of them were sensitive to antibiotics. The work was supported by the project No.2/5139/27 of the Slovak Scientific Agency VEGA.

Effect comparison of bacteriocinogenic strain *Enterococcus faecium* CCM4231 with probiotic character and its bacteriocin on selected parameters in rabbits

Szabóová R. (1), Chrastinová L. (2), Simonová M. (1), Stropfiová V. (1), Vasilková Z. (3), Lauková A. (1), Rafay J. (2)

(1) *Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia*

(2) *Centre of Agricultural Research, Nitra, Slovakia* (3) *Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia*

Nowadays, new, natural antimicrobial agents are searched to prevent bacterial, viral and fungal infections. *Enterococcus faecium* CCM4231 is bacteriocin- and CLA-producing strain with probiotic properties. The ability of CCM4231 strain to survive in rabbits and its effect as well as the effect of its bacteriocin 4231 on microbiological, biochemical- cholesterol, glucose, calcium, enzymes, immunological- phagocytic activity, zootechnical parameters- feed consumption, weight gain, feed conversion, mortality and occurrence of *Eimeria* spp. oocysts was determined. Seventy-two rabbits were divided into 3 groups: experimental group-EG1 with the application of CCM4231 strain, experimental group-EG2 with bacteriocin 4231 administration during 21 days in both groups EG1 and EG2 as well as control group-CG without coccidiostat. The experiment lasted for 42 days. CCM4231 strain and bacteriocin 4231 did not show negative influence on the phagocytic activity, biochemical parameters, health status and growth performance of rabbits. After application of CCM4231 strain, reduction of coagulase-positive staphylococci ($p < 0.01$) on days 7 and 35 was noted comparing to CG. Coagulase-positive staphylococci are one of the most frequent contaminants in rabbits breeding. That is, the use of CCM4231 strain offers an acceptable way to improve welfare, health and meat quality of rabbits. The work was supported by the project No.2/5139/27 of the Slovak Scientific Agency VEGA

Sensitivita aro mutantů *Salmonella enterica* ke komplementu, vaječnému bílku a EDTA

Šebková A., Gregorová D., Crhánová M., Rychlík I.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno Hudcova 70 Brno 621 00

aro mutantů *Salmonella* sp. jsou auxotrofní pro aromatické kyseliny a jsou méně virulentní pro člověka a většinu zvířat. Z tohoto důvodu se mutace v genech, které kódují biosyntézu aromatických aminokyselin, hojně využívají k přípravě avirulentních vakcín *S. enterica*, které jsou určeny k imunizaci různých hospodářských zvířat. Snížená virulence aro mutantů je vysvětlována jejich neschopností produkovat aromatické aminokyseliny jako je phenylalanin, tyrosin a tryptofan. V naší studii více zaměřili na aroA a aroD mutace u *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium*. Testovali jsme aroA a aroD mutanty, připravené lambda red rekombinací u *S. Enteritidis* a transpozonové mutanty u *S. Typhimurium*. Zjistili jsme, že všichni aro mutantů byli desetkrát více citliví ke krevnímu séru než divoký kmen. Tato baktericidní aktivita krevního séra se ztratila po jeho zahřátí na teplotu 56°C po dobu 30 minut, kdy došlo k inaktivaci komplementu. aro mutantů byli také až padesátkrát citlivější k vaječnému bílku a EDTA než divoký kmen. U aroA a aroD mutantů u *S. Enteritidis* jsme provedli komplementaci aroA a aroD naklonovaným do pCR2.1. Pokud byl pAroA použit ke komplementaci u aroA mutantů, nebo pAroD u aroD mutantů, byla míra rezistence k zmíněným faktorům vrácena zpět na původní úroveň divokého kmene. Avšak pokud byl pAroA použit ke komplementaci u aroD mutantů nebo pAroD u aroA mutantů, nedošlo ke změně v míře rezistence k výše zmíněným faktorům.

Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in wild game from central Slovakia.

Štefanidesová K. (1), Boldiš V. (1), Košťánová Z. (2), Kanka P. (3), Kocianová E. (1), Špitalská E. (1)

(1) Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dubravska cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovakia; (2) Regional Office of Public Health in Ziar nad Hronom, Sladkovicova 9, 965 24 Ziar nad Hronom, Slovakia; (3) Regional Veterinary and Food Administration, SNP 612, 965 24 Ziar nad Hronom, Slovakia

A. phagocytophilum (AP) is an emerging tick-borne pathogen with wide geographic distribution, an etiologic agent of human and veterinary diseases. In Europe, it is transmitted mainly by *I. ricinus*. Several animal species have been implemented as potential reservoirs of AP. *R. helvetica* (RH) seems to be prevalent in *I. ricinus* in central and northern Europe. Its pathogenic potential has not been completely elucidated in spite of being described as possible explanation of sudden cardiac death. The aim of this study was to assess the prevalence of AP, RH and other bacteria of Anaplasmataceae and Rickettsiaceae families in 109 wild animals, namely 30 roe deer, 49 red deer, 28 wild boars and 2 mouflons. Animals were hunted in three districts from June 2005 to December 2006. Group - and species - specific sets of primers targeting the 16S rRNA gene of eubacteria and ehrlichiae, *gltA* and *ompA* of rickettsiae, *groESL* and *msp4* of AP, and sequencing were used to identify microorganisms in spleen samples of studied animals. AP was detected in 15 (50%) roe deer, 26 (53.1%) red deer and in one mouflon. None of 28 wild boars was positive. Sequence analysis of *msp4* coding region showed the presence of different AP variants. RH was found only in one roe deer. High prevalence of AP in deer (51.9%) assessed in this study supports the role of cervids as natural reservoirs of this bacterium. Role of wild boars seems to be insignificant. This study was supported by VEGA2/7020 and APVV-51-009205.

Production of interferon-gamma in the blood and lymphatic organs of pigs with chronic infection *Mycobacterium avium* subsp. *avium*

Stepanova H. (1, 2), Kudlackova H. (1), Kotlarova E. (1), Faldyna M. (1, 3)

(1) *Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 62100, Brno;* (2) *Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2, 61137, Brno;* (3) *University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 61242, Brno*

Mycobacterium avium subsp. *avium* (MAA) infection of pigs is a chronic disease, often without clinical manifestations. The aim of our present experiment was to describe lymphocyte subpopulations which are sources of IFN- γ in PB and lymphoid organs. We stimulated with specific antigen in vitro PB and cells isolated from spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) from three MAA-infected and three control pigs. Total amount of IFN- γ was carried out using ELISA method and the lymphocyte subpopulations producing IFN- γ were detected by flow cytometry. Total amount of IFN- γ was higher in the spleen and lower in MLN. We did not detect any IFN- γ in non-infected animals. IFN- γ producing cells have both phenotypes: CD3+ or CD3-. A part of CD3- cells could be NK cells. Double positive CD4+CD8+ lymphocytes (memory helper T cells) were the main subpopulation of CD3+ cells producing IFN- γ . The subpopulation CD3+CD8hi (cytotoxic T lymphocytes) was also a source of IFN- γ . We detected very low IFN- γ production in gamma/delta T lymphocytes. Phenotype of IFN- γ producing cells was similar in all monitored compartments. We can conclude that pigs with chronic MAA infection are able to respond by IFN- γ production in both blood and lymphoid organs (spleen and MLN). Lymphocyte subpopulations which are a source of IFN- γ are phenotypically memory-helper and cytotoxic T lymphocytes and probably NK cells. The study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (1B53009).

Prevalencia termostabilného enterotoxínu EAST 1 u terénnych kmeňov

Zajacová Z., Alexa P., Hamřík J., Konstantinová L.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno

V rokoch 2006 a 2007 bolo 239 izolovaných kmenov *E. coli* od chorých prasíat vyšetrených na prítomnosť termostabilného enterotoxínu EAST 1 pomocou PCR reakcie. Kmene boli zároveň priebežne vyšetované multiplex PCR reakciou na prítomnosť toxínov (STa, LT). Sérotypizáciou boli zistené O a K antigény, ako aj fimbriové adhezíny aglutinačnými metódami. Zistili sme, že 30% (72) z vyšetrených kmeňov bolo EAST 1 pozitívnych, pričom 9,7% (7) neobsahovalo genetickú informáciu pre STa ani LT. EAST 1 a LT pozitívnych bolo 76% (55), EAST 1 a STa pozitívnych bolo 11% (8). Najčastejším sérotypom EAST 1 pozitívnych *E. coli* bol kmeň O149:K88 (63,8%) s genetickou informáciou pre termolabilný enterotoxín LT. Adhezín F18 bol zistený u 9,7% kmeňov. Väčšina pozitívnych kmeňov pochádzala od odstavených prasíat s diareou. Z daných výsledkov sa dá predpokladať, že termostabilný enterotoxín EAST 1 môže predstavovať významný faktor virulencie *E. coli*, ktorý môže hrať rolu v patogenéze kolinfekcií prasíat. Práca vznikla za podpory projektu QH71055.

Infekcia vírusom chrípky typu A indukuje protilátky špecifické pre PB1-F2 proteín

Krejnosová I. (1), Gocníkova H. (1), Bystrická M. (1), Blaškovičová H. (2), Yewdell J. (3), Bennink J. (3), Russ G. (1)

(1) Virologický ústav, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika; (2) Úrad verejného zdravotníctva SR, Národné referenčné centrum pre chrípku, Trnavská cesta 52, 826 45 Bratislava, Slovenská republika; (3) Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA

PB1-F2 proteín vírusu chrípky typu A (IAV) je kódovaný alternatívnym čítacím rámcom (+1) konzervatívneho génu pre PB1 proteín. Predpokladáme, že bunky infikované s IAV môžu uvoľňovať PB1-F2 proteín, ktorý potom zabíja neinfikované bunky, najmä bunky imunitného systému, zhromažďujúce sa v mieste infekcie. V dôsledku toho sú indukované protilátky špecifické pre PB1-F2 proteín (anti-PB1-F2 Abs). S cieľom preskúmať tvorbu anti-PB1-F2 Abs, sme analyzovali myšie séra a konvalescentné séra pacientov, ktorí prekonali chrípku. Myšie séra boli získané po dvoch intranazálnych infekciách s vírusmi A/PR/8/34 (H1N1) a A/MISS/1/85 (H3N2), s 50% letálnou dávkou. Metódou ELISA bol preukázaný významný vzostup titra anti-IAV Abs. Syntetický PB1-F2 proteín poslužil ako antigén pri testovaní anti-PB1-F2 Abs v sérach. Napriek tomu že ELISA u myších sér nepreukázala výskyt anti-PB1-F2 Abs, ich vzostup bol potvrdený u 40% testovaných ľudských sér. Prítomnosť anti-PB1-F2 Abs v myších aj ľudských sérach bola preukázaná imunoprecipitáciou a imunofluorescenciou, teda metódami, pri ktorých sa proteín PB1-F2 nachádzal vo svojej natívnej konformácii. Práca je súčasťou projektov VEGA 2/6022/06 a APVV1605/06.

Súčasnú možnosti využitia myšacieho modelu pre štúdiu patogenezy ľudských gamaherpesvírusov

Mistríková J. (1, 2)

(1) *Katedra mikrobiológie a virológie PRIF UK, 84215 Bratislava;* (2) *Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava*

Herpetické vírusy, ktoré sú v prírode veľmi rozšírené predstavujú vyše 200 zástupcov infikujúcich rôzne živočíšne druhy. U človeka poznáme 8 vírusov, ktoré sú zodpovedné za celkom odlišné ochorenia. HHV-1 (herpes labiálny), HHV-2 (herpes genitálny), HHV-3 (ovčie kiahne a pásový opar), HHV-4 (EBV infekčná mononukleóza a nádory lymfatického systému), HHV-5 (CMV infekčná mononukleóza a infekcie novorodencov), HHV-6 (exantémové ochorenie novorodencov), HHV-7 (žiadne klinicky zjavné príznaky ochorenia), a HHV-8 (Kaposiho sarkóm u pacientov s AIDS). Súčasné znalosti o patogeneze niektorých ľudských herpetických vírusov by nebolo možné získať bez experimentov robených in vivo na laboratórnych myšiach. Svedčia o tom veľmi významné výsledky získané štúdiom mechanizmov latencie ľudského HHV-1 ale aj CMV. Najviac rozšírený onkogénny herpetický vírus ľudí (EBV), nemal doposiaľ okrem 3 druhov opíc žiaden živočíšny model, na ktorom by sa dal študovať. Aj množenie tohoto vírusu v systéme in vitro naráža na veľké ťažkosti. Preto príprava vakcíny proti EBV nebola doposiaľ úspešná. Objav nového myšacieho herpetického vírusu, ktorého genóm je homologický s ľudskými gamaherpesvírusmi, a ktorý je všeobecne akceptovaný ako model pre štúdiu živočíšnych gamaherpesvírusov, nám poskytuje veľké možnosti. Cieľom prednášky bude informácia, o tom, ako tieto možnosti využívame v našom laboratóriu.

Faktory virulence viru vakcinie a jejich role při indukci buněčné imunity

Němečková Š., Kutinová L., Žárková K., Hainz P., Babiarová K., Gabriel P., Kryštofová J.

Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2

Studovali jsme vliv virům kódovaných imunosupresivních faktorů na specifickou buněčnou imunitní odpověď CD8+ T buněk, indukovanou u myši během infekce rekombinantním virem vakcinie nesoucím gen E7 lidského papilomaviru 16. Sledovali jsme jak gen pro virový inhibitor CC chemokinů (vCCI), gen kódující 3 β -hydroxysteroiddehydrogenázu, a geny hostitelského spektra K1L a C7L anebo ko-exprese solubilního buněčného TGF β receptoru II nebo Flt3 ligandu ovlivňují buněčnou imunitní odpověď proti rekombinantnímu viru. Buněčnou odpověď jsme stanovovali testy ELISPOT, intracelulárním barvením cytokinů a tetramerovým testem. Kvantitativní stanovení virové DNA (Q-PCR) bylo ukazatelem množení viru vakcinie in vitro a in vivo. Ukázali jsme, že exprese většiny studovaných genů pozitivně nebo negativně ovlivňuje množení viru vakcinie v organismu a že míra replikace viru pak koreluje s velikostí vyvolané imunity. Přímé ovlivnění buněčné imunity jsme pozorovali u nereplikujícího se viru vakcinie MVA, kde delece genu pro 3 β -hydroxysteroiddehydrogenázu vedla ke zvýšení odpovědi vůči E7 HPV16 proteinu i vůči virovému proteinu E3L. Tento výsledek může mít značný význam pro další vývoj vakcín na základě viru MVA.

Systémová a slizniční imunitní odpověď proti chřipkovému viru

Prokešová L. (1), Zanvit P. (1), Havlíčková M. (2)

(1) Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK, Studničkova 7, 128 00, Praha 2;

(2) Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Chřipka a chřipkové epidemie jsou závažným zdravotnickým a společenským problémem. Místem vstupu infekce je respirační trakt a dobrá slizniční imunita může infekci zabránit. Běžně používaná parenterální vakcinace inaktivovaným virem nenavozuje dostatečnou slizniční imunitu a nenavozuje heterosubtypovou křížovou protekci, která by byla velmi žádoucí z hlediska hrozící pandemie ptačími subtypy chřipkového viru typu A. Křížovou protekci se někdy daří navodit přirozenou infekcí nebo slizniční imunizací živým virem, což však není bez rizika. Na myším modelu chřipkové infekce se nám podařilo navodit heterosubtypovou křížovou protekci po imunizaci inaktivovaným virem cestou respiračního traktu za použití bakteriálního adjuvans - inaktivovaného *Bacillus firmus* (BF). Tato bakterie stimuluje přirozenou a specifickou imunitu, sama o sobě zvyšuje odolnost proti chřipkové infekci a jako adjuvans při imunizaci specifickým antigenem zvyšuje tvorbu protilátek proti nevariabilním vnitřním virovým antigenům a navozuje heterosubtypovou imunitu v pokusech in vivo.

Príprava fúzných proteínov kódovaných vírusom herpes simplex 1 a testovanie ich imunogenity z pohľadu prípravy rekombinantnej vakcíny

Rajčáni J. (1), Ďurmanová V. (1), Sapák M. (2), Košovský J. (1), Režuchová I. (1), Buc M. (2), Kúdelová M. (1)

(1) Virologický ústav SAV, Dúbravská 9, 84505 Bratislava; (2) Imunologický ústav LFUK, Bratislava, SR

Plazmid PinPointXa-1 (Promega) bol použitý na prípravu biotinylovaných fúzných polypeptidov vírusu herpes simplex 1 (HSV-1/HHV-1): veľmi skorého proteínu IE63/ICP27, skorých proteínov tymidín kinázy (TK/UL23), proteínu OBP/UL9, veľkej podjednotky ribunkleotidreduktázy (RRI/UL39) a ektodomény obalového glykoproteínu D (gD313/US6). Výsledky imunizácie jednotlivými polypeptidmi, nepatogénnym gE_{minus} mutantom kmeňa ANGpath a DNA vakcínou exprimujúcou celý gD1 (pcDNA 3.1-gD) boli porovnané na myšiach Balb/c. Hoci všetky rekombinantné proteíny indikovali protilátky, imunizácia pomocou OPB, RR1 a TK nemali nijaký ochranný účinok v protekčnom teste. Obsah PFU v infekčnej jednotke 1 LD₅₀ stúpol 90x po imunizácii polypeptidom IE63/ICP27, 800 násobne po imunizácii gD313 a až 4000 násobne po imunizácii gD1/DNA vakcínou. Leukocyty periférnej krvi ako aj splenocyty myší imunizovaných gD313 odpovedali na stimuláciu purifikovaným antigénom gD313 pri koncentrácii 5 mikrogr/0.1ml, kým leukocyty z myší imunizovaných gD1/DNA vakcínou pri dávke 1 mikrogr/0.1ml. Hladinu interleukínov (Th1 – IL-2, TNF, IFN gamma; Th2 – IL4, IL-6) sme hodnotili ako pomer sekrécie stimulovaných a nestimulovaných leukocytov z imunizovaných zvierat a ako pomer ich sekrécie zo stimulovaných buniek od imunizovaných a neimunizovaných zvierat. Leukocyty myší imunizovaných proteínom gD313 produkovali cytokíny triedy Th1 ako aj Th2; splenocyty produkovali len cytokíny Th2, najmä IL-4.

Molekulární patogeneze klíšťové encefalitidy

Růžek D., Vancová M., Kopecký J., Štěrba J., Šťastná H., Grubhoffer L.

Parazitologický ústav, Biologické centrum Akademie věd České republiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice Přítrodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Klíšťová encefalitida (KE) představuje jednu z nejzávažnějších arboviróvých neuroinfekcí v Evropě a Asii; každoročně bývá zaznamenáno více jak 10.000 lidských případů tohoto onemocnění. V naší studii jsme se zaměřili na studium patogenního procesu na modelu dospělé laboratorní myši a v podmínkách *in vitro*. Myši infikované virem KE vykazují charakteristické onemocnění centrální nervové soustavy včetně akutní zánětlivé reakce v mozku. Předpokládá se, že zánětlivá reakce v případě KE sehrává významnou úlohu v obraně před letální infekcí způsobenou neurovirulentními kmeny. Provedli jsme sérii experimentů s myšmi nesoucími těžkou kombinovanou imunosupresi a myšmi knockoutovanými v genu pro CD8+ lymfocyty infikovanými virulentním kmenem viru KE. Na základě adoptivních přenosů imunity jsme překvapivě pozorovali imunopatologický účinek CD8+ lymfocytů při KE vedoucí k fatálními konci onemocnění. Histopatologické vyšetření myších mozků odhalilo lymfocytární infiltraci okolí drobných cév či mening, u knockoutovaných myší se na reakci organismu na infekci podílely mikroglie, v tkáni byly pozorovány četné gliové uzlíky. Popsali jsme virem indukovanou apoptózu v myších mozcích i v kultuře myších neuroblastů. Obdobně kultury lidských CNS buněk (neuroblasty, meduloblasty, glioblasty) vykazovaly charakteristický cytopatický efekt související s apoptózou buněk. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie jsme charakterizovali řadu ultrastrukturálních změn CNS buněk infikovaných virem KE.

Antibodies induced by the light chain of influenza A haemagglutinin moderate the course of in vivo influenza infection

Varečková E., Gocník M., Fislova T., Mucha V., Russ G., Kostolansky F.

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, 845 05 Bratislava, Slovak Republic

The effect of antibodies induced by the light chain of influenza A virus haemagglutinin (HA2 gp) on the course of influenza infection was followed. BALB/c mice were immunized with recombinant vaccinia viruses (VVr) expressing chimeric haemagglutinin, composed from HA1 and HA2 gp of influenza A virus of different subtypes, originated from viruses A/PR8/34(H1N1) and A/NT/60/68(H3N2). IgG fraction from sera of immunized mice was applied intravenously to mice which were subsequently infected with influenza A virus. We showed that antibodies induced by two-step immunization with VVr (106 PFU/mouse) expressing HA2 gp of homologous subtype to the challenge virus A/Mississippi/1/85(H3N2), improved the survival of mice by 36% in comparison to the control mice, immunized with wild type vaccinia virus not expressing influenza virus proteins. The protection effect mediated by specific IgG was confirmed also by the lower levels of infectious virus in lungs and by earlier elimination of virus and vRNA from lungs of immunized mice than in the control. The passive transfer experiments showed that antibodies induced by HA2 gp moderate influenza A infection and cause earlier recovery from the lethal infection. These studies confirmed our previous observation that intravenously applied HA2-specific monoclonal antibodies contribute to the protection of mice against the lethal influenza A infection. Supported by VEGA, SR, grants Nos. 2/6077/6, 2/7065/7 and by APVV/51 – 021605.

Effect of viral 3-(beta)-hydroxysteroid dehydrogenase on immunogenicity of MVA virus

Babiarova K., Mocova K., Kutinova L., Hainz P., Krystofova J., Gabriel P., Nemeckova S.

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Experimental Virology, U Nemocnice 1, CZ-128 20 Prague 2, Czech Republic

Vaccinia viruses produce 3-(beta)-hydroxysteroid dehydrogenase (A44L gene) which is involved in downregulation of inflammatory responses to virus infection. The effect of A44L on the properties of the non-replicating vaccinia virus such as MVA have been not described. We prepared MVA virus with deletion of A44L gene. When we compared the growth curves of the deletion mutant and the parental virus we found that the deletion of A44L gene from MVA did not influence the replication of MVA virus in chicken embryo fibroblasts (CEF). We also determined the effect of 3-(beta)-HSD on the T cell immune response against viral protein E3L and a recombinant antigen SigE7-LAMP from human papillomavirus 16 (HPV16-E7). Deletion of A44L from MVA resulted in statistically significant increase of the T cell response of Balb/c mice to E3L protein and of C57Bl/6 mice to HPV16-E7 protein. The specificity of the effect of deletion was confirmed using the reverse mutant. The work was supported by grant 310/05/H533 from Grant Agency of the Czech Republic.

Immunogenicity of recombinant herpes simplex virus 1 glycoprotein D candidate vaccine in mice

Ďurmanová V. (1), Sapák M. (2), Košovský J. (1), Režuchová I. (1), Kúdelová M. (1), Buc M. (2), Rajčáni J. (1)

(1) Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, SK, (2) Institute of Immunology, Faculty of medicine, Comenius University, Bratislava, SK

To test immunogenicity of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) envelope glycoprotein D (gD) as potential vaccine, Balb/c mice were immunized with ectodomain of gD (comprised 313 amino acids), with the plasmid pcDNA3.1-gD (encoding the full length gD and used as DNA vaccine) and with live attenuated HSV-1 (gE deleted), respectively. As revealed by ELISA test, antibody titers were high following immunizations with gD313 as well as gE/del (1:128,000) and the lowest following immunization with the gD DNA vaccine (1:8,000). Nevertheless protection test showed that gE/del virus, gD DNA vaccine as well as gD ectodomain protected mice against lethal challenge with virulent HSV-1 strain SC16. We also followed the production of selected Th1 (IL-2, TNF and IFN- γ) and Th2 cytokines (IL-4 and IL-6) secreted by cultured peripheral blood leukocytes and splenocytes, using the fluorokine multianalyte base kit. Leukocytes coming from immunized mice produce increased levels of both Th1 as well as Th2 type cytokines after specific gD313 stimulation *in vitro*. Especially the levels of IL-4 and TNF were significantly higher (8-10 fold increase as compared to controls). Splenocytes isolated from immunized mice showed little increase of cytokine production, with exception of IL-4 (24 fold higher increase as compared to non-immunized controls). Thus the gD ectodomain of HSV-1 is an important immunogenic and protective antigen, which could be used as the part of an experimental herpes vaccine.

**Testování účinnosti dezinfekčních prostředků na virus Těšínské choroby,
Aujeszkyho choroby a virus vezikulární stomatitidy**

Dvořáková H., Prodělalová J., Reichelová M.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno

Základem většiny metod kvantifikujících viricidní aktivitu dezinfekčních prostředků je cytopatický efekt vyvolaný replikací viru na buněčných kulturách. Testování germicidní aktivity dezinfekčních prostředků bylo provedeno v suspenzi a pro virus zaschlý na povrchu. Testovány byly dezinfekční prostředky: Chloramin BM, Incidin Plus, Lysoformin 3000, Mikasept KP, Sekusept Forte. Jako zkušební viry byly použity: virus Těšínské choroby (CAPM V-86, V-37), virus Aujeszkyho choroby (CAPM V-166, V-327) a virus vezikulární stomatitidy (CAPM V-499, V-331). Metodou suspenzního i povrchového testu inaktivoval virus Těšínské choroby alespoň o 4 lg a vyhověl požadavkům (ČSN EN 14675) Mikasept KP. Zbylé dezinfekční prostředky snížily titr viru nedostatečně. Virus Aujeszkyho choroby inaktivovaly alespoň o 4 logaritmické řády všechny testované dezinfekční prostředky, kromě Chloraminu BM, který snížil titr CAPM V-166 při povrchovém testu o 3,75 lg. Pro inaktivaci vezikulární stomatitidy byly vzhledem k vysoké cytotoxicitě ostatních dezinfekcí testovány pouze Chloramin BM a Mikasept KP. Oba tyto dezinfekční prostředky snížily při suspenzním i povrchovém testu titr viru dostatečně. Výsledky prokázaly, že inaktivace viru vázaného na povrchu je obtížnější než inaktivace viru v suspenzi. Potvrdila se vysoká rezistence nebalených virů (virus Těšínské choroby) k chemické inaktivaci. Práce byla podporována Státním úřadem pro jadernou bezpečnost (smlouva č.21/06).

Modifikace virových částic M-PMV pro imunizace

Grznárová P., Lipov J., Špička J., Ruml T.

*Vysoká škola chemicko-technologická Ústav biochemie a mikrobiologie, č.320
Technická 5 166 28 Praha 6 - Dejvice*

Cílem práce je prověřit hypotézu, že přítomnost virových proteinů a simulace tvaru virových částic zvyšuje imunitní odpověď cílového organismu. In vitro připravené virové částice s vystaveným peptidem na povrchu jsou určeny pro imunizace s cílem porovnat jejich imunogenitu se stejnými peptidy, které nejsou součástí takovýchto částic. Pro tento účel byly navrženy následující cílové sekvence: sekvence 6 histidinů (His-tag) a trimer této sekvence, Flag-tag a jeho trimer, část genu Forkhead box protein (FoxP3-marker regulačních T-lymfocytů). Pro dosažení expozice peptidu na povrchu virové částice byla sekvence kódující daný peptid připojena ke genům pro kapsidový (CA) a nukleokapsidový (NC) protein Mason Pfižerova opičího viru v expresním vektoru pET22b tak, že výsledný protein obsahuje peptid na N-konci. Fúzní proteiny byly produkovány v *E. coli* BL21DE3, izolovány z buněk a purifikovány na chelatačním nosiči za denaturačních podmínek. Využili jsme přirozenou schopnost NC vázat ionty kovů. Při lyzi buněk byly pozorovány rozdílné vlastnosti jednotlivých proteinů, na základě toho byly modifikovány i podmínky jejich purifikace. Denaturované proteiny byly ve čtyřech krocích dialyzovány v pufru bez močoviny a následně zahuštěny na koncentraci 1 mg/ml. Příslušné množství proteinů bylo pak dialyzováno s přísadkou MS2 RNA, čím došlo ke složení částic podobných virům, které je možné pozorovat transmisním elektronovým mikroskopem. Takto připravené částice už jsou vhodné pro imunizace.

**Molekulárna analýza podstaty rezistencie lyzogénnych kmeňov
Staphylococcus aureus k polyvalentnému stafylokokovému bakteriofágu 812**

Gulášová L., Pantůček R., Růžičková V., Doškař J.

*Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie,
Oddělení genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37, Brno*

Nárast počtu patogénnych bakteriálnych kmeňov rezistentných k väčšine dostupných antibiotík sa stal kritickým problémom modernej medicíny. Riešením môžu byť polyvalentné bakteriofágy, schopné lytického cyklu, ktoré sú ako alternatíva antibiotík potenciálne využiteľné vo fágovej terapii. Práca sa zaoberá interakciami polyvalentných stafylokokových fágov s hostiteľskými kmeňmi *S. aureus* s cieľom objasniť, ktoré faktory zodpovedajú za necitlivosť týchto kmeňov k fágom. Bolo zistené, že po lyzogenizácii miernymi fágmi séroskupiny B (fág 53) dochádza k navodeniu necitlivosti hostiteľského kmeňa k polyvalentnému a virulentnému fágu 812. Kmeň *S. aureus* NCTC 8511, lyzogenizovaný fágom 53, stráca senzitivitu k infekcii fágom 812 a ďalším virulentným fágom. Boli izolované mutanty fága 812, ktoré sú schopné rastu na kmeňoch lyzogenizovaných fágom 53. Rozdiely v citlivosti študovaných kmeňov k fágu 812 a jeho mutantom boli stanovené kvantitatívne. Za účelom identifikácie faktora zodpovedného za stratu senzitivity k polyvalentnému fágu 812, sme použili restriktívnu analýzu genómovej DNA fága 812 a jeho mutantu v rozmedzí hostiteľa 812a, voči ktorému sú kmene lyzogenizované fágom 53 senzitivne. Touto analýzou boli identifikované rozdiely v restriktívnych spektrách polyvalentného fága 812 a 812a a oblasti s mutačnými zmenami boli podrobnejšie charakterizované. Práca je podporená grantom MSM 0021622415 ČR a LSHM-CT-2006-019064 EU.

Experimentálny in vitro model pre štúdium vplyvu hypoxie na proliferáciu vírusom infikovaných buniek

Hrabovská Z. (1), Kopáček J. (2), Mistríková J. (1, 2)

(1) Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská Dolina, 84215 Bratislava; (2) Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava

Myšací herpetický vírus (MHV) je akceptovaným modelom pre štúdium humánnych gamaherpetických vírusov, ako je EBV a KSHV, s ktorými je fylogeneticky príbuzný. Je výrazne lymfotropný, pričom je však schopný navodiť infekciu aj epitelových a fibroblastových buniek. Vyvoláva akútne ochorenia, ktoré „vd'aka“ jeho schopnosti perzistovať v bunkách prechádzajú často do chronicity a môžu viesť až k malígnej transformácii. MHV-76 je sekvenčne identický s MHV-68 s výnimkou 9538bp dlhej delécie na ľavom konci genómu. Chýbajú mu štyri gény špecifické pre MHV(M1-M4), ako aj osem tRNA sekvencií. Replikácia v bunkových kultúrach je rovnaká ako u MHV-68. Je známe, že v podmienkach hypoxie (2% obsah O₂) dochádza k reaktivácii latentného vírusu a jeho prechodu do akútnej fázy. Pri nej by malo dochádzať k produkcii vírusových antigénov, príp. celých vírusových častíc, čo by následne malo ovplyvniť viabilitu buniek v kultúre. V práci sme pripravili latentne infikované bunkové línie, pričom sme dokázali prítomnosť perzistujúceho vírusového genómu, zisťovali sme produkciu povrchových vírusových antigénov nepriamou imunofluorescenciou u buniek neinfikovaných, ako aj latentne infikovaných, kultivovaných v podmienkach normoxie aj hypoxie a taktiež sme charakterizovali ich rastové vlastnosti. Ako sme očakávali, došlo k zvýrazneniu fluorescenčného signálu u buniek kultivovaných v hypoxii a takéto bunky boli spomaľené v raste a dochádzalo u nich skôr k fáze odumierania.

Porovnání citlivosti nested RT-PCR a kvantitativní qRT-PCR v diagnostice viru reprodukčního a respiračního syndromu prasat

Janková J., Lobová D., Celer V.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav mikrobiologie a imunologie

Virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV) je zařazen do čeledi Arteriviridae, rodu Arterivirus. Patří mezi malé obalené viry a jeho genom je tvořen jednořetězcovou RNA s pozitivní polaritou. Onemocnění, které tento virus způsobuje, je charakterizováno pozdními aborty, porody mrtvých mláďat a u selat respiračními potížemi. V postižených chovech způsobuje významné ekonomické ztráty. Diagnostika metodami molekulární mikrobiologie se provádí metodou nested RT-PCR. Při této dvoukrokové reakci ale hrozí riziko kontaminace vzorku a může tak docházet k nespecificky pozitivním výsledkům. Alternativou k tomuto postupu je kvantitativní qRT PCR, která je pokládána za citlivější, specifitější a navíc umožňuje kvantifikaci viru ve vzorku. Cílem naší práce bylo navrhnout a zavést qRT-PCR pro diagnostiku PRRSV a ověřit její citlivost a specifitu na souboru klinických vzorků. Standard pro kvantifikaci reakce byl získán naklonováním odpovídajícího úseku genomu viru do plazmidového vektoru. Kalibrační křivka pak byla sestrojena pomocí sériových ředění toho standardu. Celkem 44 vzorků (25 vzorků tkáně plic a 19 krevních sér) bylo vyšetřeno klasickou RT-PCR a současně qRT-PCR metodou. Více než polovina vzorků (54,5 %) vykazovala shodné výsledky při vyšetření oběma metodami. Pouze ve dvou případech (4,5 %) byla metoda qRT-PCR citlivější a ve zbylých 18 případech (41 %) vykazovala vyšší citlivost metoda nested RT-PCR.

Characterisation of changes in lymphocyte subsets and their activity in rabbits after experimental infection with myxoma virus

Jeklová E. (1, 2), Levá L. (1), Matiašovic J. (1), Faldyna M. (1, 2)

(1) *Veterinary Research Institute, Brno, CZ;* (2) *University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, CZ*

Myxoma virus (MXV) causes the systemic disease in the European rabbit. Despite many *in vitro* studies on the function of MXV immunomodulatory proteins exist, little is known about the dynamics of interaction of the virus with the integrated host-immune system during infection. The aim of our study was to characterise changes in lymphocyte subsets and nonspecific proliferation activity of lymphocytes from different lymphoid compartments on the 2nd, 4th, 6th, 9th and 11th day after infection. The relationship between alterations of immune parameters and dynamic of virus dissemination through the body was investigated. Using flow cytometry, decrease of T cells including CD4+ and CD8+ and increase of B cells was observed in draining popliteal lymph node 4 day after virus inoculation. From day 6, comparable changes were seen in collateral popliteal lymph node, spleen and blood. From day 9, the mentioned lymphocyte subsets tended to reach their original state in all lymphocyte compartments except draining popliteal lymph node. Proliferation activity of lymphocytes was reduced from day 4 or 6 and remained reduced until the end of experiment in all observed lymphoid organs. Two days after infection, copies of MXV genome were recorded in draining popliteal lymph node and in fewer amounts in peripheral blood lymphocytes, using real-time PCR. From day 4, viral genome was detected in all studied lymphoid organs. Supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZE 0002716201).

Analysis of biological activities of human recombinant interleukin IL-29

Tóthová V. (1), Sukopová I. (1), Mistrfková J. (1, 2), Kabát P. (1, 2)

(1) Comenius University, Department of Microbiology and Virology, Bratislava, Slovak Republic; (2) Institute of Virology, SAS, Bratislava, Slovak Republik

Interleukin IL-29 is a newly identified class II cytokine receptor ligand that induces antiviral responses after virus infection. Here we investigate its biological activities in BHK-21 and SP2/0 cells infected with murine lymphotropic gammaherpes virus 4 (Murine herpesvirus 68) and his deletion mutants. Expression of IL-29 was induced with the poly I:C double stranded RNA polymer in human peripheral leukocytes and total RNA was isolated. Open reading frame coding IL-29 was obtained from cDNA by PCR amplification. The chimeric interleukin comprising signal peptide from human CD33 and polyhistidine tag on carboxyl terminus was expressed in mouse myeloma cell line. The antiviral activities were studied with plaque titration on BHK-21 cells. The antiproliferative activities of IL-29 were studied in suspension cell line SP2/0 infected with MHV. IL-29 inhibits replication of gammaherpes virus 4 and did not have a influence on SP2/0 proliferation. This research was supported by Slovak Research and Development Agency (the grant No.APVT-20-008904)

Detekcia a subtypizácia vírusu chrípky vo výteroch z kloaky, zobákovej dutiny vtákov, voľne žijúcich na území Slovenska v roku 2006

Kabát P. (1)(4), Gronesová P. (1), Betáková T. (1), Mižáková A. (2), Trnka A. (3).

(1) Virologický ústav SAV, Bratislava (2) Vojenská nemocnica Ružomberok, pracovisko Bratislava (3) Trnavská univerzita, Trnava (4) Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava

Vtáčia chrípka je infekčná choroba vyvolaná vírusom chrípky typu A z čeľade Ortomyxovírusov. Je známe, že všetkých 16 hemaglutinínových a 9 neuraminidázových subtypov vírusu je schopných infikovať divo žijúce vodné vtáctvo, ktoré sa tak stáva rezervoárom vírusu chrípky trvale kolujúceho vo vtácej populácii. V súčasnosti sa pozornosť upriamuje na štúdium vysoko patogénneho kmeňa H5N1. Cieľom našej práce bolo štúdium šírenia vírusov vtácej chrípky a ich subtypizácia v populácii migrujúcich vtákov na území Slovenska. V roku 2006, sme vyšetrili 142 vzoriek z kloaky a hrdla voľne žijúcich vtákov, ktoré boli odchytené na Senianskych rybníkoch na východe Slovenska a v Národnom parku: Parížske močiare na západnom Slovensku. Z výterov zobáka, kloaky sme vyizolovali RNA a pomocou reverznej transkriptázy sme pripravili cDNA, ktorú sme použili ako templát pre nestovanú PCR reakciu. U jedincov chytených na jar, keď k nám priletajú migrujúce druhy bolo infikovaných až 54,5% jedincov. V júni sme detegovali vírus chrípky u 26 % vyšetovaných vtákov a na jeseň sa počet pozitívnych vtákov zvýšil na 44,12 %. Na jar 2006 cirkulovali v populácii vtákov na západnom Slovensku najmä kmene H3N5, kým na východnom Slovensku prevládali kmene H9N5 a H7N6. V jeseni 2006 sme na západnom Slovensku vo vyšetovaných vzorkách detegovali najmä kmene H9N5, H7N6 a H10N3. Práca bola podporená agentúrou APVV-51-004105.

Identifikace a charakterizace profágů u PVL-pozitivních kmenů *Staphylococcus aureus*

Kahánková J. (1), Pantůček R. (1), Machová I. (2), Petráš P. (2), Růžičková V. (1), Doškař J. (1)

(1) Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie, Brno, CZ; (2) Státní zdravotní ústav, CEM, Národní referenční laboratoř pro stafylokoky, Praha, CZ

Druh *Staphylococcus aureus* je původce závažných komunitních a nosokomiálních onemocnění. Patogenita stafylokokových kmenů souvisí s přítomností faktorů virulence. Jedním z nich je Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL) kódovaný geny lukS-PV a lukF-PV lokalizovanými na fágovém genomu. PVL je spojován s kožními a systémovými infekcemi a letální nekrotizující pneumonií. Cílem této práce je popsat PVL-konvertující fágy, stanovit jejich příbuznost a posoudit míru horizontálního přenosu u komunitních izolátů *S. aureus* v ČR. Soubor 29 kmenů *Staphylococcus aureus* a jejich fágů byl genotypově charakterizován metodami PFGE, PCR-typizace a sekvenční typizace. Výsledky ukazují, že PVL-pozitivní izoláty včetně 11 kmenů MRSA mají značně heterogenní genetické pozadí. Zastoupení profágů v kmenech bylo: 54 %- 1 typ profága, 39 % - 2 typy profágů a 7 % - 3 typy profágů. Profágy nalezené v genomech kmenů byly rozděleny dle typu integráz, typu kapsidových genů a obsahu genů kódujících toxiny. S ohledem na rostoucí výskyt PVL-pozitivních izolátů *S. aureus* v Evropě, je důležité charakterizovat PVL-konvertující bakteriofágy, které jsou nositeli genů lukPV. Jejich popis má zásadní význam pro pochopení vlivu fágů na vznik nových virulentních klonů, jejich evoluci a také průběh bakteriální infekce. Práce byla podporována granty MŠMT ČR (č. MSM00216224-15) a EU (LSHM-CT-2006-019064).

Recombinant Murine herpesvirus 72 deficient in viral immune evasion molecule MK3 (MK3del MHV72): study on pathogenetical properties in vitro

Halášová Z., Belvončíková P., Valovičová M, Tangelmayer R., Režuchová I. and Kúdelová M.

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Murid herpesvirus 4 (MuHV-4) currently serves as a model for study of human gamma-herpesvirus pathogenesis. It codes for MK3 protein that similarly as K5 protein of KSHV are members of a novel E3 ubiquitin ligase family (E3s) structurally related to viral immune evasion molecules possessing RING-CH finger domain at the amino terminus possessing ubiquitin ligase activity. They both have been designated as modulator of immune recognition (MIR) 1, and 2. The first mammalian homologue to MIR 1, and 2 were recently characterized and named as membrane associated RING-CH (MARCH) family, to which belongs also MK3. However, precise physiological function of MARCH family members remains as yet unknown. Moreover, in the specific case of MK3, it selectively targets the rapid degradation of nascent class I heavy chains in the ER while they are associated with the class I peptide-loading complex (PLC). To find out the role of MK3 protein encoded by the Murine herpesvirus 72 (clone h.3.7) during viral infection in vitro or in vivo, the recombinant MK3del MHV72 virus was prepared. Infection of mammalian cells with recombinant MK3del MHV72 virus comparing to that with wild type MHV72 strain was followed to elucidate the requirement for MK3 (in wild type MHV transcribed as part of a bicitronic mRNA) during viral infection. This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No.APVV-51-005005 and VEGA #2/7096/27.

Detekce protilátek proti herpesviru koní 1 a 4 typově specifickým testem ELISA

Molinková D., Celer V., Trundová M.

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav mikrobiologie a imunologie,
Brno, Česká republika*

Herpesvirus koní 1 (EHV-1) i herpesvirus koní 4 (EHV-4) jsou v populaci koní rozšířeny celosvětově. EHV-1 je původcem onemocnění dýchacího aparátu, způsobuje u březích klisen zmetání v poslední třetině březosti a může být příčinou neurologických poruch. EHV-4 byl zatím potvrzen pouze v případech mírných respiračních infekcí. Oba tyto viry jsou geneticky i antigeně blízce příbuzné. Významnější rozdíly lze nalézt v aminokyselinové sekvenci jejich glykoproteinu G (gG). Cílem práce bylo získat rekombinantní gG obou jmenovaných virů a použít je jako antigen v druhově specifickém testu ELISA, jehož pomocí by bylo možné rozlišit protilátky proti EHV-1 a EHV-4 v sérech koní. Geny kódující gG EHV-1 a gG EHV-4 byly naklonovány do plazmidových vektorů, exprimovány v systému *E. coli* a purifikovány pomocí metalochelatační afinitní chromatografie. Takto získané antigeny byly použity k vyšetření 100 koňských sér testem ELISA. Výsledky vyšetření jednotlivých sér svědčí o možnosti využití testu k sérologické typizaci protilátek proti oběma virům. Práce byla financována z prostředků grantu GAČR: 524/06/P051.

Herpesvirus psů: nové možnosti diagnostiky a výskyt viru v ČR

Molinková D., Celer V.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav mikrobiologie a imunologie, Brno, Česká republika

Herpesvirus psů 1 (CHV-1) byl poprvé popsán v roce 1965 a je rozšířen celosvětově. Přítomnost viru byla již dříve potvrzena i v chovech psů na našem území. U dospělých psů se může infekce CHV-1 projevit jako mírné onemocnění horních cest dýchacích, pohlavního traktu nebo oka. U chovných fen je CHV-1 považován za příčinu reprodukčních problémů zahrnujících infertilitu, aborty a porody neživotných štěňat, u kterých probíhá infekce jako generalizované hemoragické onemocnění s vysokou mortalitou. Cílem práce bylo zavedení molekulárně diagnostické metody nested PCR (polymerázová řetězová reakce s reamplifikací) pro přímý průkaz CHV-1 v klinickém a sekčním materiálu. Dále bylo naším úkolem zjistit podíl CHV-1 na reprodukčních problémech u psů na území ČR. Od roku 2002 do současnosti byly vyšetřeny vzorky orgánů štěňat z 63 případů abortů nebo úhynů do tří týdnů po narození. Pro vyšetření byla izolována DNA z plic, ledviny a sleziny uhynulých štěňat. Celkem 14 vzorků (22.2%) bylo pozitivních. V jedenácti případech byla metodou nPCR prokázána přítomnost virového genomu ve všech sledovaných orgánech, ve třech případech pouze v plicní tkáni. Metoda nPCR se osvědčila jako rychlý a vysoce specifický postup pro průkaz sledovaného viru v terénních vzorcích.

Využití real-time PCR k detekci herpesviru koní 1 v sekčním materiálu

Molinková D., Celer V.

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav mikrobiologie a imunologie,
Brno, Česká republika*

Herpesvirus koní 1 (Equid herpesvirus 1, EHV-1) je v populaci koní rozšířen po celém světě. Mezi onemocnění způsobovaná tímto virem patří postižení dýchacích cest, myeloencefalopatie a aborty u březích klisen. EHV-1 je schopen navodit v hostitelském organismu latentní infekci, která je celoživotní. K reaktivaci viru dochází při oslabení imunity hostitele. Diagnostika onemocnění spočívá v přímém průkazu viru izolací na buněčné kultuře (BK) nebo pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Cílem naší práce bylo navrhnout a zavést pro rutinní diagnostiku EHV-1 metodu kvantitativní PCR (qPCR), která by eliminovala nevýhody konvenční PCR. K navržení oligonukleotidových primerů a sondy pro tento test byl použit "The universal Probe Library software" (<http://www.universalprobelibrary.com>) firmy Roche. Jako materiál pro testování citlivosti a specifity reakce byly použity terénní vzorky, které naše laboratoř dříve vyšetřila na přítomnost EHV-1 jinými metodami. Tento materiál pocházel z území ČR a byl odebírán v letech 2000 - 2006. Námi navržená qPCR se ukázala být specifickou a vysoce citlivou metodou pro detekci virového genomu (průkaz 10 kopií genomu při srovnání se sériově řaděným plazmidovým standardem). Ve srovnání s původně používanou konvenční PCR jsme byli schopni prokázat virový genom v množství menším než 10^3 kopií v 1 mg tkáně. V kontrolách obsahujících příbuzný EHV-4 nedocházelo k pozitivní reakci. Práce byla financována z prostředků grantu GAČR: 524/06/P051.

Detekcia a charakterizácia prasačích cirkovírusov typu 2 izolovaných na Slovensku

Pistl J., Nováčková M., Polláková J., Jacková A., Mojžišová J., Vilček Š.

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice

Cirkovírusy predstavujú čeľaď malých DNA vírusov, ktoré infikujú viacero živočíšnych druhov. Pre svine je významný prasačí cirkovírus typu 2 (porcine circovirus – PCV2). Najčastejšou klinickou formou cirkovírusovej infekcie svíň je podstavový multisystémový syndróm chradnutia (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome – PMWS). Nakoľko údaje o detekcii PCV2 na Slovensku sú značne limitované zamerali sme sa na komplexnú diagnostiku slovenských PCV2 izolátov na základe anamnézy, klinických príznakov, patologickkej anatómie, biologických (imunohistochemia, izolácia vírusu) a molekulo-genetických metód (PCR, Real-time PCR, DNA-sekvencovanie a fylogenetické analýzy). U postihnutých odstavčiat boli zreteľné príznaky PMWS s patologicko-anatomickými zmenami na pľúcach, lymfatických uzlinách a obličkách. Imunohistochemicky na kryorezoch bol PCV2 detegovaný najmä v lymfatických uzlinách a v obličkách. Imunoperoxidázovým testom (IPMA) bol PCV2 preukázaný v homogenátoch orgánov postihnutých prasiat na bunkách bunkovej kultúry PK-15. V PCR reakcii bol zistený 263bp fragment v 19 z 32 vzoriek. Pomocou Real-time PCR s využitím SYBR Green fluorescenčného farbenia bolo možné kvantifikovať DNA vírusu, čo umožnilo rozlíšenie postihnutých zvierat od odstavčiat bez klinických príznakov. Sekvencovaním 263bp PCR produktu (ORF 2) bola vykonaná prvá fylogenetická analýza 12 izolátov PCV2 na Slovensku.

Determinácia infekčného statusu bovinnej vírusovej hnačky v oblasti severného Slovenska

Pistl J., Levkutová M., Polláková J., Mojžišová J., Levkut M., Mikula I.

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice

Vírus hnačky hovädzieho dobytku (Bovine Viral Diarrhoea Virus - BVDV) je ekonomicky významný patogén v chovoch HD. Infekcia sa v chove manifestuje hlavne ako intrauterinná infekcia plodu, ktorej jedným z dôsledkov je narodenie perzistentne infikovaných (PI) imunotolerantných teliat. Významnú úlohu zohráva aj akútna infekcia teliat, sprevádzaná transientnou imunosupresiou. Cieľom našej práce bolo stanoviť infekčný status BVDV infekcie v ucelenej oblasti, ktorou bol región v dĺžke okolo 150 km na severe Slovenska, kde je dobytok v čase vegetácie vyhánaný na pastvu. Vyšetrených bolo 12 chovov na prítomnosť BVDV špecifických protilátok (BVDV-Ab) metódou „okno mladých zvierat“ (15 zvierat vo veku 6-24 mesiacov) ako aj BVDV-Ab v bazénovej vzorke mlieka. U zvierat na 8 farmách bola séroprevencia v rozsahu 66-100%, v rátane pozitívnej bazénovej vzorky, čo poukazuje na prítomnosť PI zvierat v chove. Séroprevencia na 3 farmách sa pohybovala okolo 55%, s negatívnou bazénovou vzorkou mlieka, jednalo sa o akútnu infekciu v chove. Na jednej farme sa nezistili BVDV-Ab, tieto zvieratá sú plne vnímavé k BVDV infekcii. U 3 séronegatívnych teliat bol detegovaný BVDV antigén (BVDV-Ag) v krvných leukocytoch. Kombinácia úrovne séroprevencie, s BVDV-Ab v bazénovej vzorke mlieka a detekcie BVDV-Ag poukazuje na infekčný status v chove a indikuje zavedenie preventívnych opatrení, respektíve stratégiu ozdravovacieho procesu.

Genotyping and reclassification of porcine enteroviruses isolated from 1950 to 1970 in Czechoslovakia

Prodělalová J., Valíček L.

*Veterinary Research Institute, Collection of Animal Pathogenic Microorganisms,
Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic*

The porcine enteroviruses (PEV, family Picornaviridae) were described as causative agents of neurological disorders known as Teschen/Talfan disease, reproductive failure and dermal lesions of swine. Based on cytopathic effect (CPE), replication properties in different host cell lines, and serological assays, the porcine enteroviruses were divided into three groups: CPE group I. comprises serotypes 1-7 and 11-13, CPE group II. serotype 8 and CPE group III. serotypes 9 and 10. Recently, porcine enteroviruses were reclassified on the basis of genome sequencing data. A new picornavirus genus named Teschovirus (formerly PEV CPE group I.) was established. The aim of the study was retyping and reclassification of more than 30 strains of porcine enteroviruses deposited in the Collection of Animal Pathogenic Microorganisms (CAPM). Viral strains were isolated over the period 1950-1970 predominantly from pigs with encephalomyelitis. The isolates were classified mostly as porcine enterovirus, serotype 1 (PEV-1) based on physicochemical properties of their virions and growth characteristics. The viral strains were reclassified using nested RT PCR protocol allowed detection of three porcine enterovirus CPE groups. The resulting reclassification is essential with regard to international regulations on the quality of stored materials in the CAPM. The study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZE0002716201).

Torque tento virus u zvířat

Saláková M. (1), Němeček V. (2), Schánilec P. (3), Zendulková D. (3), Tachezy R. (1)

(1) Oddělení experimentální virologie, Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, Praha 2, 128 20, Česká republika; (2) Národní referenční laboratoř pro virové hepatitidy, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, Česká republika; (3) Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Fakulta veterinárního lékařství, Palackého 1/3, Brno, 612 42, Česká republika

Torque teno virus (TTV) je malý neobalený DNA virus s jednořetězcovým kruhovým genomem o velikosti okolo 3,8 kb. V současné době je virus řazen do nově vzniklého přechodného rodu Anellovirus. TTV je velmi často přítomen v populaci po celém světě, v České republice je prevalence TTV u dárců krve 52,6%. TTV je velmi variabilní, virové izoláty lze rozdělit do 5 hlavních fylogenetických skupin. Anelloviry se nevyskytují pouze u lidí, ale byly identifikovány také u primátů, tan, koček, psů a prasat. Velikost genomu anellovirů je u zvířat menší, pohybuje se od 2,2 kb u tan až 3,7 kb u šimpanze. Přítomnost TTV byla sledována u vzorků sér 50 prasat, 27 psů, 1 kočky a po 7 vzorcích slepic, skotu a koní pomocí třech PCR systémů. První byl PCR systém s primery odvozenými z nekódující oblasti genomu lidského izolátu, druhý s primery odvozenými z nekódující oblasti genomu tany (Tbc-TTV) a třetím systémem byly primery specifické k prasečímu izolátu TTV (Sd-TTV). První systém detekoval TTV DNA u třech vzorků prasat, druhý u dvou vzorků psů a jednoho vzorku koně, třetí systém detekoval TTV u 31 vzorků prasat (31/50, 62%). TTV se nachází nejenom u lidí, ale i u zvířat. Sekvence zvířecích izolátů je však značně odlišná. Použití PCR systémů odvozených od jiných druhů vede spíše k náhodné detekci TTV, což ale umožňuje identifikaci nových virů. Pomocí druhově-specifických primerů pak lze zjistit pravděpodobnou prevalenci TTV u daného druhu. U prasat byla zjištěna prevalence 62%.

Antigénová a sekvenčná intersubtypová homológia epitopov HA2 glykoproteínu hemaglutinínu (HA) vírusu chrípky A ľudského a vtáčieho pôvodu

Stropkovská A., Mucha V., Fislová T., Gocník M., Kostolanský F. a Varečková E.

Slovenská akadémia vied, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Široké spektrum hostiteľov a variabilita vírusu chrípky A sú dôvodom prečo neexistuje univerzálny spôsob prevencie. Hľadajú sa konzervatívne antigény, ktoré stimulujú protektívnu imunitnú odpoveď. Monoklonové protilátky MAb špecifické voči HA2 gp, konzervatívnej časti hlavného povrchového antigénu vírusu chrípky, čiastočne ochránia myši pred letálnou infekciou vírusom chrípky. V tejto práci sme testovali reaktivitu HA2-špecifických protilátok s ľudskými H3 a vtáčimi vírusmi H4, H7 subtypu a hľadali sme koreláciu medzi reaktivitou MAb a príslušnými sekvenčiami HA2 gp. Protilátky rozpoznávajúce antigénne miesto v pozícii 125-175 z N-konca HA2 gp reagovali v ELISA aj rýchlej kultivačnej metóde s vírusmi homológneho subtypu H3 a s vírusom subtypu H4, ale nereagovali s vírusom subtypu H7. Sekvenčnou analýzou sme zistili rozdiel v 8 pozíciách segmentu HA2 medzi H3 a H4 subtypom a v 18 pozíciách medzi H3 a H7 subtypom, čo môže byť dôvodom straty reaktivity týchto MAb s vírusmi subtypu H7. MAb rozpoznávajúca oblasť aa 1-35 N-konca HA2 gp reagovala s vírusmi homológneho subtypu H3 a H4 resp. H7. Väzbové miesto pre túto protilátku, ktoré je zachované u všetkých troch subtypov, je lokalizované medzi aa 3-14 N-konca HA2 gp a je vysoko konzervované u všetkých subtypov HA. Popísané protilátky redukovali in vitro replikáciu vírusu chrípky subtypov H3 a H4, čo je významné vzhľadom na konzervatívnosť rozpoznávaných epitopov. Podporované projektami VEGA 2/6077/6, 2/7065/7, APVV/51-021605.

Spontánní výskyt lyzogenie a bakteriocinogenie v sedmi rodech čeledi Enterobacteriaceae

Šmarda J., Šmajš D.

Biologický ústav LF MU, Kamenice 5, Budova A6, Brno, 625 00, CZ

Porovnali jsme přirozenou incidenci kmenů, spontánně produkujících bakteriofágy a molekulární bakteriociny, v populacích sedmi rodů bakterií čeledi Enterobacteriaceae. Náš osvědčený postup – křížový test na produkci i citlivost na agarových plotnách – nás přinutil omezovat počet kmenů testovaných souborů na 50 – 55. Náhodnost jejich výběru byla limitována požadavkem jejich nepatogenity či jen podmíněné patogenity, jejich vlastními zdroji a jejich územním výskytem. Incidence lyzogenie a bakteriocinogenie v jednotlivých rodech byla následující: *Escherichia* (36,6 %; 13,9 %), *Salmonella* (30,8 %; 5,8 %), *Citrobacter* (18,2 %; 0), *Leclercia* (10,0 %; 0), *Enterobacter* (7,7 %; 1,9 %), *Yersinia* (3,8 %; 11,3 %), *Kluyvera* (1,8 %; 0). Je patrné, že produkce mírných bakteriofágů je v čeledi Enterobacteriaceae výrazně častější než tvorba klasických bakteriocinů, jakkoliv jsou vzájemně nezávislé. (Je zřejmé, že profágy se v prostředí horizontálně přenášejí snadněji.) *Escherichia coli* je jediný druh s vysokou incidencí obou; často je patrná jejich nepřímá závislost. Při volbě kmenů, zastupujících v souboru rod, velmi záleží na jejich druhu; mezidruhové rozdíly incidencí jsou značné.

Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy v podmínkách in vitro

Šťastná H. (1), Růžek D. (1, 2), Kopecký J. (1, 2), Grubhoffer L. (1, 2)

(1) *Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice;* (2) *Parazitologický ústav, Biologické centrum Akademie věd České republiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice*

Místo klíštěcího sání je dějištěm nepřeborného množství dějů vzájemných interakcí hostitele a parazita. Hostitel se brání nepřátelské invazi mimo jiné mobilizací imunologické odpovědi, klíštěcím protitahem je potlačení hostitelských zánětlivých, hemostatických a imunitních reakcí; jako prostředník mu k tomu slouží sliny vylučované do rány. Lokální imunosuprese často přijde vhod klíšťatý přenášeným patogenům, kteří tak mají usnadněný vstup do hostitelova těla a mohou tak snáze způsobit infekci. Jedním z takových patogenů je také virus klíšťové encefalitidy (VKE) řadící se do čeledi Flaviviridae rodu Flavivirus. My jsme studovali vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci VKE v in vitro podmínkách za použití několika savčích buněčných linií (myší fibroblasty a makrofágy, prasečí ledvina). Pozorovali jsme efekt klíštěcích slin na replikaci přírodního izolátu VKE kmene 166, kdy byla replikace po ošetření buněk slinami v časných intervalech zvýšena více jak desetinásobně. U českého prototypového kmene VKE tento efekt pozorován nebyl.

Study of the UL27.5 gene found located antisense to Herpes simplex virus glycoprotein B gene.

Tangelmayer R., Ďurmanová V., Kúdelová M., Režuchová I.

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Herpes simplex virus is one of the largest DNA viruses with genome „crowded“ of high number of genes (at least 94 ORFs). Up to date, studies on complicated and highly complex transcription of all HSV genes observed the presence of at least three nested ORFs pairs located at both complementary DNA strands. The most striking feature of antisense genes found is mutually exclusive mode of their expression. The third ORF pair found in recent past is the UL27.5 mapping antisense to glycoprotein B that is essential for viral replication. Without expect, protein UL27.5 (575 aa) encoded by antisense ORF reacted with a polyclonal antibody against gJ. In in vitro experiments the putative UL27.5 protein is expressed by gamma2 subclass kinetics mostly accumulated in the cytoplasm of infected cells. To find out an essential character for UL27.5 gene product, direct evidence is needed including final confirmation of its function/s. To characterize the role of the UL27.5 gene during HSV replication, recombinant virus of ANGpath strain deleted in function of UL27.5 is under preparation via introducing specific mutations into UL27.5 ORF thus resulting in abortive termination of UL27.5 transcription but not affecting gB protein expression. For identification of protein encoded by the UL27.5 gene, the anti-UL27.5 immune monoserum was prepared by immunization of mice with the UL27.5 native protein prepared by PinPoint expression system. This work was supported by the grant VEGA #2/7095/7.

Characterisation of vaccinia virus expressing the Flt3 ligand gene

Žůrková K., Otáhal P., Kutinová L., Hainz P., Kryštofová J., Němečková Š.

ÚHK, U Nemocnice 1, 12820 Praha

We constructed two recombinant vaccinia viruses, strain Praha (P13), for expression of the human gene encoding soluble isoform of the cytokine Flt3 ligand (FL) under control of the early H5 or the strong synthetic early-late E/L VV promoter. We derived also double recombinants expressing β -galactosidase or GFP. The effect of FL expression on replication of recombinant viruses was determined by detection of reporter gene products *in vitro* and by Q-PCR of DNA isolated from mouse ovaries. We observed that the high FL expression by P13-E/L-FL inhibited markedly viral replication in J774.G8 or HEL cells and in mice, whereas this effect was weak in the case of P13-H5-FL. Analyzing the intracellular mature virions (IMV) by SDS-PAGE we found that the strong FL expression driven by E/L promoter resulted in incorporation of FL and in further changes of viral proteins in the membrane and the core of IMV particle. MALDI-TOF analysis has shown differences in H3L, D8R, 28K, hypothetical 10kDa viral proteins and in cellular proteins tubulin and glutaraldehyde dehydrogenase. Fractionation of virions revealed the FL molecule inside the viral core. However, a portion of the FL molecule seemed to be displayed on the surface of IMV, because the viral infectivity of IMV could be neutralized with anti-FL antibodies. The same antibodies were able to precipitate P13-E/L-FL particles as observed by electron microscopy. The work was supported by grant 310/05/H533 from GACR.

Mikrobiální znečištění toku Lužická Nisa na našem území

Baudišová D., Benáková A.

Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M. v.v.i., Podbabská 30, 160 62 Praha 6

Jedním z extrémně antropogenně ovlivněných území v České republice je povodí Lužické Nisy. Lužická Nisa pramení na severním úbočí Černostudničního hřebenu, a během několika kilometrů vtéká do městských aglomerací Jablonec nad Nisou a Liberec. Na našem území má Lužická Nisa délku 53 km. Presentovány jsou výsledky dvouletého sledování mikrobiologických a hlavních chemických ukazatelů. Lužická Nisa je před vtokem do obce Lučany (nad soutokem s Lučanským potokem) velmi málo mikrobiálně znečištěna, hodnoty mikrobiologických ukazatelů se pohybují v jednotkách ktj na 10 ml (v přepočtu desetiny ktj/ml), po soutoku s Lučanským potokem a po několika kilometrech v profilu Jablonec nad Nisou-Paseky již jejich hodnoty téměř nesplňují požadavky přípustného znečištění toků dle Nař. vlády 61/2003 Sb. Situace se i nadále zhoršuje a to zejména díky nedostatečné kanalizaci a řadě černých kanálů a výpustí. V aglomeraci se již hodnoty indikátorů fekálního znečištění pohybují řádově ve stovkách ktj/ml a desetinásobně tak překračují imisní standardy dle Nař. vlády 61/2003 Sb. Odtok z ČOV Liberec (126 000 EO) již situaci dále nezhoršuje. Bylo jednoznačně prokázáno, že mikrobiologické ukazatele jsou pro sledování komunálního znečištění povrchových vod výrazně citlivější než chemické.

Výskyt a stanovenie rodu Legionella vo vzorkách vody

Cíchová M., Prokšová M., Morovič M.

Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábřežie arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava

Legionely sú podmienenene patogénne mikroorganizmy s prirodzeným výskytom v povrchových a podzemných vodách, s civilizačným výskytom v distribučných vodovodných sieťach väčších budov, v klimatizačných zariadeniach, vo vode z chladiacich veží, v plaveckých bazénoch. Vo všeobecnosti je málo prác zaoberajúcich sa výskytom legionel v podzemných vodách, i napriek tomu, že v niektorých krajinách predstavujú dominantný zdroj pitnej vody. Cieľom naše práce bolo detekovať legionely v širokom spektre vôd. Legionely boli stanovované kultivačnými metódami podľa STN ISO 11731 a STN ISO 11731-2 a súběžne metódou PCR s dvoma rôznymi dvojicami primerov mip1 a mip2 pre gén mip a semi-nested PCR s primermi LEG 225, LEG 448, LEG 858 pre gén 16S rRNA. Záchyt legionel kultivačnými metódami bol porovnateľný s metódami PCR pre väčšinu analyzovaných vôd. Najvyššia citlivosť bola dosiahnutá metódou semi-nested PCR. Prítomnosť legionel bola potvrdená aj v podzemných vodách všetkými testovanými metódami.

Mikrobiologická kvalita balené vody čepované z watercoolerů stále aktuální

MUDr. Markéta Chlupáčová

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42

Příspěvek podrobně rozebírá problematiku zdravotní nezávadnosti balené pramenité vody čepované přes watercoolery/aquabary. Uvádí legislativou nastavená kritéria zaměřená jak na bezpečnost tak na kvalitu (Vyhl. MZ č.275/2004 Sb., Vyhl. MZ č. 38/2001 Sb.) a faktory ovlivňující kvalitu balené vody čepované tímto způsobem. Upozorňuje na fakt, že kontrola balené pramenité vody čepované přes uvedená zařízení není předmětem dozoru hygienické služby a odpovědnost za kvalitu čepované vody závisí na smluvně dodavatelském vztahu. Podrobněji rozebírá legislativou stanovenou povinnost výrobce uvést na barelu větším než 5 litrů dobu spotřeby. Příspěvek dále uvádí poznatky ze screeningových šetření a expertiz zaměřených na mikrobiologickou kvalitu vody čepované přes aquabary/watercoolery provedené naším pracovištěm v loňském roce. .

Diferenciace mikrobiálních společenstev různě znečištěných vod na základě jejich fylogenetické odlišnosti

Mlejnková H. (1), Horáková K. (1), Dudová P. (2)

(1) Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i., Mojmírovo nám. 16, 612 00 Brno, ČR; (2) Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Znečištění vod je jedním z nejvýznamnějších faktorů, které ovlivňují stav vodních ekosystémů a současně určují strukturu přítomných bakteriálních společenstev. Cílem této práce bylo charakterizovat rozdíly ve struktuře bakteriálních společenstev ve vzorcích povrchových vod odebraných na lokalitách různě ovlivněných antropogenní činností. V naší práci jsme použili genotypovou metodu, využívající odlišnosti bakteriální RNA, tj. zaměřenou na všechny přítomné bakterie včetně nekultivovatelných, pomalu rostoucích apod. Celkový počet bakterií ve vzorcích různě znečištěných povrchových vod byl stanoven fluorescenční mikroskopií po obarvení buněk DAPI. Analýza bakteriálních společenstev byla provedena fluorescenční in situ hybridizací (FISH) s oligonukleotidovými sondami značenými barvivem Cy3, jejíž pomocí byly přítomné bakterie rozděleny do 6 fylogenetických skupin: Eubacteria, α -, β -, γ -proteobacteria, Cytophaga-Flavobacterium a Archea. Míra znečištění vod byla charakterizována fyzikálně-chemickými, chemickými a standardními mikrobiologickými parametry. Rozdíly ve složení bakteriálních společenstev ve vzorcích vod s různým stupněm znečištění (neznečištěné povrchové vody, rybníční vody, komunálně a průmyslově znečištěné vody, odpadní vody aj.) určené na základě celkových počtů bakterií a jejich poměrného zastoupení v jednotlivých fylogenetických skupinách je zhodnoceno v této studii.

Thionové bakterie AMD vód v oblasti Banská Štiavnica- Šobov

Welward L. (1), Perhacova Z. (1), Michalkova E. (1), Slaukova E. (2), Bella J. (2), Masa B. (1), Polak Š.

(1) KBVE, FEE, TU Zvolen, T. G. Mysaryka 2117/24, Zvolen 96053, Slovakia; (2) Stredná priemyselna škola Samuela Stankovianskeho, Akademická 13, 969 01 Banská Štiavnica, Slovakia

V súvislosti s AMD (acid mine drainage – kyslé banské vody) vodami z oblasti Banská Štiavnica Šobov sme niekoľkoročným monitorovaním a nato naväzujúcimi submerznými laboratórnymi pokusmi overili prítomnosť mezofilných thionových baktérií *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans* a *Leptospirillum* sp. súčasne sme v týchto vodách zistili aj prítomnosť termofilných baktérií, ktoré sme pomnožili v laboratóriu pri 58 °C. Pre submerznú laboratórnu fermentáciu sme použili metódu kultivácie v tekutom médiu. V prvom prípade sme inokulovali s 50 ml obratej vzorky AMD vód z vybraných odberových miest skúmanej lokality. V druhom prípade sme inokulovali s nami pripravenej kryoskopickkej konzervy – Šobov. Porovnali sme ich so zbierkovými kultúrami. Pokusy trvali priemerne 150 hodín, každých 24 hodín, sme merali pH, mernú vodivosť χ , oxidoredukčný potenciál U. Identifikáciu baktérií sme robili elektrónovým a svetelným mikroskopom. Výsledky potvrdili, že v submerzných podmienkach na pôde M 80 dochádza k optimálnej produkcii baktérií v cca 60 hodine kultivácie, pričom pH je cca 2,2, oxidoredukčný potenciál stúpa z cca 400 mV na 600 mV a merná vodivosť mierne klesá zo 14 na 8 mS/ cm. Ukázalo sa, že vlastnosti baktérií izolovaných zo skúmaného prostredia, z kryoskopickkej konzervy a zo zbierkových kmeňov sú si veľmi podobné a porovnateľné s literárnymi údajmi. Táto práca bolapodporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-20-019905

Akumulácia Cd, Cu, Cr(VI), Ni, Pb, Zn z vodného prostredia kmeňmi *Aspergillus niger*

Šimonovičová A. (1), Žemberyová, M. (2), Hlinková E. (3)

*Katedra pedológie (1), Katedra analytickej chémie (2), Katedra genetiky (3),
Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina, 842 15
Bratislava*

Sledovali sme akumuláciu Cd, Cu, Cr(VI), Ni, Pb a Zn z experimentálnych roztokov - 1. banská voda + zmes ťažkých kovov, 2. zmes ťažkých kovov a 3. roztoky ťažkých kovov samostatne. Použili sme dva kmene druhu *Aspergillus niger* izolované z rôzneho prostredia. Kmeň An 1, kontrolný, pochádza z fluvizeme modálnej (pH H₂O/KCl = 7,7/7,4; C/N = 20,3) z lokality Gabčíkovo. Kmeň An 3 pochádza zo silne kyslého až veľmi silne kyslého (pH H₂O/KCl = 5,3/4,8) riečneho sedimentu potoka Blatina s prirodzeným obsahom As (363 mg/kg) a Sb (93 mg/kg) z oblasti, kde sa ťažil pyrit a antimonit (Pezinok - Kolársky vrch). Zo zmesných roztokov obidva kmene An 1 a An 3 akumulovali najviac Cr(VI) a to od 39,9 do 44,5 % do a najmenej Cd (9,4 - 14,4 %) a Ni (7,8 - 9,7 %). Zo samostatných roztokov ťažkých kovov obidva kmene najviac akumulovali Cd (An 3 = 92,2 % a An 1 = 72,6 %) a najmenej Cr(VI) a Cr(III). Pri akumulácii ťažkých kovov z obidvoch zmesných roztokov bol aktívnejší kmeň An 1. Akumulácia kmeňom An 3 bola vždy vyššia zo samostatných roztokov ťažkých kovov a v niektorých prípadoch až o 30 % väčšia ako kmeňom An 1. Príspevok je súčasťou grantovej úlohy VEGA1/2352/05 a 1/4360/07.

Mikrobiální kontaminace vod pocházející z pastvin

Baudišová D., Benáková A., Mojžíšková-Gálková H.

Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M. v.v.i., Podbabská 30, 160 62 Praha 6

Pastva ovcí a dobytka je důležitou součástí horské a podhorské krajiny a spásání působí příznivě na obnovu luk. Předmětem tohoto příspěvku je prezentace výsledků stanovení mikrobiologických ukazatelů v tocích protékajících pastvinami (většinou bezejmenné toky 1. řádu) ve čtyřech lokalitách. Zároveň byly hledány možnosti odlišení mikrobiálního znečištění zemědělského a antropogenního původu. Bylo zjištěno, že mikrobiální kontaminace toků, protékajících pastvinami není vysoká, hodnoty mikrobiologických ukazatelů většinou splňují požadavky přípustného znečištění toků dané Nař. vlády 61/2003 Sb.; jsou však silně závislé na množství srážek. Vzhledem k relativně málo intenzivnímu hospodaření, většinou i v těchto oblastech komunální znečištění většinou výrazněji ovlivňuje jakost vody v tocích, než pastva dobytka. Na základě našich výsledků lze konstatovat, že v případě fekálního znečištění zemědělského původu se ve vzorcích vyskytuje více enterokoků než termotolerantních koliformních bakterií. V případě antropogenního znečištění většina izolovaných enterokoků patří do skupiny *E. faecalis/hirae* (41 %), v případě zemědělského znečištění se vyskytuje mezi enterokoky více hipurát negativních kmenů (75 %, oproti méně než 20 % u kmenů antropogenního původu) a bývají izolovány druhy *Streptococcus bovis* a *S. equinus*. Pokud jde o rezistenci k vybraným antibiotikům (P, Va, E, T, Cf, hS, hG), tak při studiu 107 kmenů nebyl zaznamenán výrazný rozdíl mezi kmeny zemědělského a antropogenního původu.

Vliv aplikace kejdy na mikrobiální kvalitu vody v rybnících

Horáková K., Mlejnková H.

Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i., Mojmírovo nám. 16, 612 00 Brno, ČR

Účelem hnojení rybníků organickými hnojivy je vyrovnaní poměru uhlíku k obsahu přítomných biogenních prvků (dusík, fosfor). Mikrobiálním rozkladem organického hnojiva vzniká dostatek uhlíku ve formě oxidu uhličitého, nezbytného pro fotosyntetickou asimilaci fytoplanktonu, který je důležitou součástí potravního řetězce (fytoplankton-zooplankton-ryby). Cílem práce bylo zhodnocení potenciálních hygienických rizik, souvisejících s charakterem nejčastěji používaného hnojiva – kejdy. Hodnocení bylo prováděno na základě stanovení indikátorových mikroorganismů a bylo doplněno údaji o vlivech dalších významných faktorů prostředí, např. sezónní klimatické změny, průtokové poměry, základní fyzikálně-chemické kvalitativní charakteristiky vody aj. Dílčí zhodnocení výsledků starších studií (80.–90. léta) a aktuálních dat z let 2006–2007 ukázala, že vliv kejdivání nemá významný vliv na množství fekálních indikátorů a přítomnost patogenních bakterií ve vodách rybářsky obhospodařovaných rybníků. Šetřením v roce 2004 však bylo zjištěno významné zvýšení počtu fekálních indikátorů 3–4 měsíce po aplikaci kejdy. Potvrzení tohoto jevu, způsobeného zřejmě rozvřením sedimentů rycí činnostmi ryb při přechodu na jiný typ potravy, by mohlo znamenat potenciální hygienické riziko právě v období rekreačního využívání rybníků. Sledováním vybraných přítoků do rybníků bylo prokázáno, že komunální odpadní vody představují svým znečištěním často významnější zdravotní riziko než kejdivání rybníků.

Sorpcia ťažkých kovov z vôd pomocou biosorbentov

Luptáková A., Mačingová E., Gešperová D.

Ústav geotechniky SAV, Watsonova 45, 043 53 Košice, Slovenská republika

Pre odstraňovanie ťažkých kovov z vôd existuje viacero technológií. Patria k nim aj environmentálne biotechnológie, ktorých podstatou môže byť napr. biosorpcia. Jedným z princípov prípravy biosorbentov je precipitácia pomocou síran-redukujúcich baktérií (SRB). Jej podstatou je extracelulárna precipitácia železa, ku ktorej dochádza pod vplyvom biogénneho sulfánu, vyprodukovaného SRB, za vzniku sulfidov železa - FexSy. Takto syntetizované biosorbentov predstavujú výborné sorbenty pre celú radu iónov ťažkých kovov. Z tohto dôvodu je predkladaný príspevok zameraný na štúdium možnosti prípravy biosorbentov na báze sulfidov železa, pomocou SRB ako aj na štúdium ich použitia pre sorpciu Cu^{2+} kationov z modelových roztokov. Pre prípravu biosorbentov bola použitá bakteriálna kultúra SRB rodu *Desulfovibrio*. Biogénne sulfidy FexSy boli pripravené za diskontinuálnych a semikontinuálnych podmienok. Sorpčné experimenty boli uskutočňované použitím modelových roztokov, v ktorých koncentrácia kationov Cu^{2+} bola 20, 100, 150 a 200 mg/l. Výsledky experimentálnych prác poukazujú na možnosť prípravy biosorbentov na báze sulfidov železa - FexSy pomocou SRB. Orientačné sorpčné experimenty za použitia uvedených FexSy dokumentujú rýchlu a účinnú sorpciu Cu^{2+} z vybraných modelových roztokov.

Mikroflóra kyslých banských vôd

Perháčová Z. (1), Michalková E. (1), Šipoš P. (2), Welward L.

(1) TU Zvolen, Fakulta ekológie a environmentalistiky, T.G. Massaryka 24, 960 53 Zvolen (2) Skušobné laboratórium - odbor ochrany kvality vôd, SVP š.p., Sládkovičová 31, 974 98 Banská Bystrica,

Kyslé banské vody (acid mine drainage), vznikajúce mikrobiologicko-chemickými dejmi v halde pyritizovaného hydrokvarcitu z ťažby kremenca v lokalite Banská Štiavnica-Šobov, predstavujú silne kyslé síranové vody (pH 2.0-2.5) s vysokým obsahom Fe, Al a ďalších ťažkých kovov Zn, Mn, Cu, Pb, As. V suťových prameňoch, v zberných jarkoch a v retenčnej nádrži sa, vedľa fyzikálno-chemických a biochemických parametrov, kvalitatívne a kvantitatívne monitoroval biosestón. Dominujúcimi druhmi boli riasy Volvocales, druh Chlamydomonas acidophila, zo skupiny Euglenophyta druh Euglena mutabilis. Zo skupiny Ciliata významné zástúpenie má r. Oxytricha. Zaznamenala sa aj prítomnosť mikromycet r. Penicillium, Mucor a železitých baktérií Leptotrix ochracea a Galionella ferruginosa. "Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č.APVV-20-019905"

Porovnanie stanovenia *Legionella* spp. vo vzorkách pitnej vody pomocou kultivačnej metódy a polymerázovej reťazovej reakcie

Prokšová M., Cíchová M., Morovič M.

Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábřeží arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava

Sledovali sme prítomnosť bakteriálneho rodu *Legionella* vo vzorkách pitnej vody z jedného odberového miesta. Na stanovenie *Legionella* spp. sme použili kultivačnú metódu podľa STN ISO 11731-2 Kvalita vody. Stanovenie *Legionella*. Časť 2: Metóda priamej membránovej filtrácie pre vody s malým počtom baktérií. Ďalej sme robili PCR reakciu s použitím primerov pre gén mip 1 (Bej a kol., 1991) a gén mip 2 (Ballard a kol., 2000). Okrem toho sme odskúšali seminested PCR (Miyamoto a kol., 1997), ktorá využíva primery pre amplifikáciu časti génu 16S rRNA (LEG 225, LEG 448, LEG 858). V práci sme využili vzorky vody z vodovodnej siete s dokázaným občasným výskytom *Legionella pneumophila*. Vzorky vody sme opakovane odoberali a na vyšetrenie sme použili objemy 10 a 1000 ml. Z desiatich odberov bola zistená prítomnosť *Legionella pneumophila* sv. 1, pomocou membránovej filtrácie a následnej kultivácie len v dvoch prípadoch, a to len v objeme 1000 ml (12,5 %), pričom bola zistená v koncentrácii okolo 10 KTJ/1000 ml. Stanovenie prítomnosti *Legionella* spp. pomocou polymerázovej reťazovej reakcie s primermi mip 1 a mip 2 bolo neúspešné, táto metóda nebola dostatočne citlivá pre stanovenie *Legionella* spp. pri danej koncentrácii. Najlepšie výsledky boli získané pomocou seminested PCR reakcie a LEG primerov. V tomto prípade sa nám podarilo dokázať prítomnosť *Legionella* spp. v vo všetkých odobraných vzorkách vody, a to aj v objeme 10 ml aj 1000 ml vzorky.

Izolácia a identifikácia enterokokov z Dunaja a pribratislavských štrkovísk

Seman M., Drahovská H., Fľaková R., Ženišová Z.

Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, SR

V okolí Bratislavy sa nachádza množstvo umelých jazier – štrkovísk, slúžiacich v súčasnosti aj ako prírodné kúpaliská. Svojou genézou sú spojené s riekou Dunaj. Hygienická kvalita vody je daná viacerými ukazovateľmi, z ktorých dominujú hydrochemické a mikrobiologické. Významným indikátorom fekálneho znečistenia sú popri koliformných baktériách aj enterokoky. Aj napriek malej odlišnosti v chemickom zložení dunajských vôd a štrkovísk, dominujú v Dunaji fekálne enterokoky (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* a *E. hirae*), naproti tomu v štrkoviskách boli v sledovanom období nájdené iba dva nefekálne druhy: *E. casseliflavus* a *E. seriolicida* (identický s genotypom *Lactococcus garviae*). Absenciu fekálnych enterokokov v štrkoviskách, dokonca aj v letných mesiacoch, počas kúpaciej sezóny, je možné vysvetliť relatívne dobrou samočistiacou schopnosťou vodného prostredia študovaných biotopov. Nízky obsah nutričného substrátu, vyjadrený ako BOD₅, CODMn, CODCr a predačný tlak organizmov zrejme nedovoľujú enterokokom výraznejšiu reprodukciu. Z hľadiska hygienických limitov daných normou STN 75 7221 pre povrchové vody môžeme štrkoviská zaradiť do II. triedy kvality. Počty fekálnych enterokokov v Dunaji pri jeho vstupe do Bratislavy sú v jednotkách o niečo vyššie než v štrkoviskách, čo je dané aj väčším obsahom organických látok. Z mikrobiologického hľadiska, vyjadreného počtom fekálnych enterokokov, bolo možné zaradiť Dunaj v sledovanom úseku do III. triedy kvality.

Mikrobiologická kvalita minerálnych a pramenitých balených vôd

Sirotná Z., Šimonyiová D., Horecká M.

Úrad verejného zdravotníctva SR, Trnavská cesta 52, 826 45 Bratislava

Minerálne vody a pramenité vody sú druhom kvalitnej mikrobiologicky bezchybnej vody pôvodného zloženia a čistoty, získavanej z vyhláseného, resp. schváleného zdroja podzemnej vody. Základným mikrobiologickým kritériom pri minerálnych a pramenitých vodách je neprítomnosť pôvodcov ochorení alebo mikroorganizmov indikujúcich ich možnú prítomnosť. Splnením tohto kritéria je neprítomnosť mikroorganizmov *Escherichia coli*, koliformných baktérií, *Pseudomonas aeruginosa*, enterokokov v 250 ml a sporulujúcich sulfit redukujúcich anaeróbných baktérií v 50 ml vyšetrenej vzorky. V pravidelných intervaloch bola sledovaná kvalita minerálnych a balených pramenitých vôd odobratých pri ich plnení, skladovaní a predaji v obchodnej sieti podľa ukazovateľov Výnosu MZ a MP SR z 15. marca 2004 č. 608/9/2004-100. Podľa požiadaviek Výnosu boli vyšetrené chemické, biologické a mikrobiologické ukazovatele vo vzorkách tuzemských a dovozových minerálnych vôd a pramenitých balených vôd. Zároveň bola v rámci tohto projektu každý rok sledovaná kvalita vybranej minerálnej vody, ktorá bola odobraná priamo po naplnení a vyšetrovaná v mesačných intervaloch počas skladovania za predpísaných podmienok v laboratóriu počas celej doby spotreby. Prezentácia analyzuje výsledky mikrobiologického vyšetrenia 186 minerálnych a pramenitých balených vôd vyšetrených v roku 2005 a 109 vzoriek vyšetrených v roku 2006.

Lékařská mikrobiologie ve výuce studijního směru Zubní lékařství na LF MU

Holá V., Woznicová V., Růžička F., Votava M.

Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty MU a FN u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 65691 Brno

Požadavky a nároky kladené praxí na absolventy studia Zubního lékařství se výrazně liší od požadavků, jež jsou kladeny na absolventy studijního programu Všeobecné lékařství. Studenti zubního lékařství by měli být více orientováni do praxe a jejich výuka by měla tuto potřebu zohledňovat. Naším cílem bylo zavedení nového předmětu Lékařská orální mikrobiologie do výuky těchto studentů. V novém předmětu se studenti seznámí s orální mikrobiologií v podání odpovídajícím potřebám jejich oboru, zejména tedy s problematikou orální mikrobiologie, např. s problémy onemocnění parodontu či tvorbu zubního kamene a kazu z mikrobiologického hlediska. Ve výuce tedy klademe důraz na mikroby se vztahem k dutině ústní, infekcím dutiny ústní a jejich patogenézí. Získané znalosti poskytnou studentům komplexní pohled na problematiku orálních infekcí a umožní jim lépe se v praxi orientovat v prevenci a léčbě těchto onemocnění u svých pacientů. Praktické úkoly umožní studentům získat praktickou zkušenost s odběry materiálů z dutiny ústní na mikrobiologická vyšetření a s jejich dalším zpracováním. Znalost mikrobiologických postupů jim poskytne reálnou představu o jednotlivých vyšetřeních, jejich úskalích a významu pro klinickou praxi. Pro odborný rozvoj studentů bude cenný především komplexní přístup při hodnocení získaných výsledků a jejich interpretaci. Nově zavedený předmět tak odráží specifické potřeby studentů studijního programu Zubní lékařství. Podpořeno grantem FRVŠ 1891-2007

První zkušenosti z výuky mikrobiologie oboru zubní lékařství na 1. LF UK v Praze

Pavlík E., Potužníková B., Šterzl I.

Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta, Ústav imunologie a mikrobiologie Studničkova 7 128 06 Praha 2

S platností od školního roku 2005/2006 byla zahájena výuka mikrobiologie v nově koncipovaném oboru zubní lékařství. Původní záměr ponechat rozsah výukových hodin stejný jako u oboru stomatologie nemohl být dodržen pro překročení max. počtu výukových hodin v příslušném semestru, takže přednášky byly redukovány o 50 %. Hlavním současným problémem není nedostatek výukových hodin pro kurs, nýbrž jejich soustředění do letního semestru 2. ročníku, kdy studenti jsou nuceni zvládnout obor v průběhu 15 týdnů, navíc při paralelní výuce samostatného oboru imunologie. Výhodou je zachování rozsahu povinné praktické výuky ve 2 týdenních blocích, z nichž první probíhá již ve 2. a 3. výukovém týdnu., druhý pak ve 12. a 13. výukovém týdnu. Povinná výuka praktik je doplněna o 6 seminářů, zaměřených tématicky. Výuky se účastní rovněž kliničtí mikrobiologové z Výzkumného ústavu stomatologického v Praze, čímž je zajištěna vazba na specifickou problematiku mikrobiologie ústní dutiny, jakož i pravidelné konzultace výukové náplně celého předmětu. Velkou pozornost jsme věnovali zvýšení efektivity pedagogického procesu s cílem maximálního využití času. Výuka je průběžně modernizována jak po obsahové, tak po didaktické stránce, zařazeny byly i nejmodernější dg. techniky za podpory grantového programu JPD3, Jak ukazují dosavadní výsledky zkoušek, k dramatickému zhoršení úrovně znalostí nedošlo.

Zkušenosti s výukou volitelného předmětu „Klinická mikrobiologie“

Čermák P.

Univerzita Karlova v Praze 1. Lékařská fakulta

Mikrobiologie se vyučuje v rámci preklinických oborů. Tato situace je dána jak charakterem oboru tak i historickým vývojem. Vývoj oboru stále více směřuje ke klinice – antimikrobní terapie, nozokomiální infekce. Studenti ve 3. ročníku teprve začínají s klinickými obory a tyto informace často nedokáží správně zařadit a udržet v paměti. Výuka probíhá v 5. ročníku ve formě dvou až tříhodinových seminářů. V předmětu Klinická mikrobiologie se zopakují základní znalosti o mikrobiologických diagnostických metodách a postupně se proberou jednotlivé syndromy důležité pro klinickou praxi – meningitidy, infekce krevního řečiště, močové infekce, mykobakteriální infekce a další. Výuka každého syndromu má jednotný postup – vyvolávající původce, klinické příznaky, možnosti laboratorní diagnostiky se zaměřením na mikrobiologické metody a terapie. Samostatný seminář je věnován antimikrobním lékům, problematice stoupající rezistence a nozokomiálním infekcím. Každý student obdrží výtisk všech témat prezentovaných v programu MS PowerPoint, do kterého si může zapisovat svoje poznámky. Zavedení tohoto systému podstatně zvýšilo úroveň znalostí. Zápočet je prováděn formou pohovoru studenta s vyučujícím, kdy tento simuluje studentovi klinickou situaci. Student musí rozhodnout o způsobu diagnostiky a terapie.

Multimediální atlas pro výuku mikrobiologie potravin

Necidová L. (1), Cupáková Š. (1), Karpíšková R. (2)

(1) Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, CZ; (2) Centrum hygieny potravinových řetězců Brno, Státní zdravotní ústav Praha, CZ

Náplní studijních programů realizovaných Fakultou veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno je mimo jiné vychovávat odborníky pro oblast kontroly zdravotní nezávadnosti a jakosti potravin a potravinových surovin. Jedním ze stěžejních předmětů oblasti studia orientovaných na analýzu potravin je mikrobiologie potravin. Atlas mikrobiologie potravin je interaktivní didaktická pomůcka určená pro studenty bakalářského i magisterského studijního programu, pro mladé začínající pedagogy a pro studenty dalších vysokých škol podobného studijního zaměření. Atlas je rozdělen do kapitol věnovaných jednotlivým druhům nebo skupinám potravinářsky či epidemiologicky (ve vztahu k alimentárním onemocněním) významných mikroorganismů. Každá kapitola zahrnuje stručnou charakteristiku mikroorganismu a metodiku jeho stanovení v potravinách, včetně nejdůležitějších konfirmačních testů. V samostatné kapitole jsou zařazeny další metody využívané v mikrobiologii potravin (stanovení reziduí inhibičních látek, mikrobiologické vyšetření pitné vody, metody využívané při detekci bakteriálních toxinů v potravinách, atd.). Textová část je doplněna přehlednými schémata a bohatou fotodokumentací. Atlas je přístupný na internetové adrese

[http : //fvhe.vfu.cz/sekce_ustavy/uhtml/index.html](http://fvhe.vfu.cz/sekce_ustavy/uhtml/index.html).

Vytvoření atlasu mikrobiologie potravin bylo financováno v rámci projektu FRVŠ 1668/2006 a výzkumného záměru MSM6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Výuka lékařské virologie na Biologické/Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Růžek D., Grubhoffer L.

*Parazitologický ústav, Biologické centrum Akademie věd České republiky,
Braníšovská 31, 370 05 České Budějovice Přírodovědecká fakulta Jihočeské
univerzity v Českých Budějovicích, Braníšovská 31, 370 05 České Budějovice*

Lékařská virologie se na českých přírodovědeckých a lékařských fakultách nevyučuje jako samostatný předmět, ale obvykle jen jako součást mikrobiologie a to navzdory tomu, že zhruba polovina lidských infekčních onemocnění je virového původu. Díky podpoře projektu Fondu rozvoje vysokých škol byl na Biologické/Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích otevřen jednosemestrální předmět Lékařská virologie sestávající z teoretické i praktické výuky o hodinové dotaci 2+2 hodiny týdně. Studenti jsou v tomto předmětu seznamováni se základními biologickými vlastnostmi medicínsky významných virových čeledí a jejich zástupců, jakož i s patogenezí jimi způsobovaných onemocnění. Cílem projektu bylo také vytvoření kvalitních studijních materiálů. Studijní materiály představují jednak výukové texty doplněné o ilustrační schémata a obrázky a jednak prezentace k přednáškám ve formátu MS PowerPoint. Úlohy praktických cvičení zahrnují kultivaci virů na buněčných kulturách a v amniové dutině kuřecích embryí, pozorování experimentální infekce laboratorní myši, hemaglutinační či komplementfixační testy a zejména moderní molekulárně-biologické testy založené na průkazu virové nukleové kyseliny. Součástí praktických cvičení je modelová situace, kdy studenti obdrží sérii „klinických vzorků“ (králíčí sérum s přidaným virem) spolu s anamnestickými údaji a popisem klinického obrazu hypotetického pacienta a na základě výsledků provedených testů se pokouší určit diagnózu.



CZ: 800 124 683

SK: 0800 124 683

biotech@biotech.cz

VWR 

Celosvětový dodavatel laboratorního vybavení



Vyžádejte si katalog
ZDARMA

www.biotech.cz