Certifikovaná metodika QJ1510338-03

Kvantifikace bakteriofága 936 v mléčných produktech metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce

Autoři:

RNDr. Kateřina Olša Fliegerová, CSc.	ÚŽFG AV ČR, v.v.i.
Ing. Jakub Mrázek, PhD.	ÚŽFG AV ČR, v.v.i.
Ing. Lenka Štrosová	ÚŽFG AV ČR, v.v.i.
Ing. Irena Němečková, PhD.	VÚM, s.r.o.
Ing. Jan Kopečný, DrSc.	ÚŽFG AV ČR, v.v.i.

Nakladatel: ÚŽFG AV ČR, v.v.i.
Místo vydání: Praha
Vydání: 1.
Vazba: brožovaná
Cena: zdarma

Praha 2018

CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. QJ1510338-03

Kvantifikace bakteriofága 936 v mléčných produktech metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce

Autoři

RNDr. Kateřina Olša Fliegerová, CSc.[a]
Ing. Jakub Mrázek, PhD. [a]
Ing. Lenka Štrosová [a]

Ing. Irena Němečková, PhD. [b]

Ing. Jan Kopečný, DrSc. [a]

a Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha
b Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Metodika vznikla jako výstup řešení projektu Ministerstva zemědělství - NAZV QJ1510338 „Fermentované mléčné výrobky a sýry pro zdravou výživu obyvatel, technologické postupy jejich výroby a metody hodnocení s důrazem na vysokou mikrobiologickou bezpečnost a zlepšené nutriční parametry“ financovaného v rámci programu KUS.

Odpovědný řešitel projektu: Ing. I. Němečková, Ph.D., VÚM
Řešitel projektu: Ing. J. Kopečný, DrSc., ÚŽFG AV ČR

ISBN 978-80-270-5006-2

OBSAH

		Strana
	ÚVOD	3
I.	Cíl metodiky	4
II.	Vlastní popis metodiky	4
II. 1	Princip metody	4
II. 2	Izolace DNA	5
II. 3	PCR primery a kvantitativní PCR (qPCR nebo RT PCR)	5
II. 4	Kalibrační křivka	6
II. 5	Ověření metody na experimentální sadě vzorků	8
III.	Srovnání novosti postupů a jejich zdůvodnění	8
IV.	Popis uplatnění certifikované metodiky	9
V.	Ekonomické aspekty	10
VI.	Seznam použité literatury	10
VII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	11
VIII.	Přílohy, dokumenty a doklady	11

Úvod

V průmyslových fermentačních výrobách se používají kmeny Gram-pozitivních eubakterií, které odvozují svou metabolickou energii z fermentace sacharidů na laktát, a proto se označují jako bakterie mléčného kvašení či stručně jako mléčné bakterie. Mlékárenský průmysl značně využívá bakteriální kmeny a druhy rodu *Lactococcus*, jakožto výchozí nebo doplňkové kultury při výrobě různých fermentovaných mléčných výrobků, zejména sýrů. Tyto zdraví prospěšné bakterie dodávají produktům texturní, organoleptické a konzervační vlastnosti, které mohou vyloučit i růst některých patogenů, avšak mohou být náchylné k napadení bakteriofágy. Tyto nukleoproteinové částice, které nesou genetickou informaci, ale nemají enzymové vybavení pro zajištění základních životních funkcí, jsou schopny infikovat vhodnou hostitelskou buňku a využít její enzymatický systém pro svou replikaci (Šilhánková, 1995). Po vniknutí genetické informace bakteriofága do hostitele mohou nastat dvě varianty. První varianta představuje situaci, kdy se DNA bakteriofága začlení do bakteriálního chromozómu jako tzv. profág. DNA bakteriofága se pak replikuje současně s buněčnou DNA, genetický materiál bakteriofága se tedy přenáší do dceřiných buněk, avšak nedochází k lýze hostitelských buněk. Tento cyklus se nazývá lysogenní. Druhou variantu představuje cyklus lytický, kdy po vniknutí bakteriofága do hostitele dochází uvnitř buňky ke vzniku virových komponent, tyto komponenty se kompletují, vzniká velký počet bakteriofágů, které způsobí lýzi buňky. Ze zlyzované buňky se pak bakteriofágy uvolňují, napadají další buňky a stávají se infekčními. Bakteriofágy, které infikují kmeny mléčných bakterií, zpomalují fermentaci, negativně ovlivňují kvalitu, bezpečnost a hodnotu fermentovaných produktů a mohou způsobit až úplnou ztrátu fermentační kapacity, takže ve svém důsledku vedou k významným hospodářským ztrátám. Studiu těchto bakteriofágů se proto věnuje mimořádná pozornost a výrazný pokrok v molekulárně biologických, genomických a proteomických metodách v posledních letech postupně odhaluje na jedné straně diverzitu a genetické procesy životních cyklů bakteriofágů a na druhé straně umožňuje pochopení interakcí mezi bakteriofágy a hostitelem (Fliegerová a kol., 2017). Metody molekulární biologie se také uplatňují jako diagnostické nástroje a umožňují rychlou a spolehlivou detekci bakteriofágů (del Rio a kol., 2007). Několik studií ukázalo, že bakteriofágy skupiny 936 jsou nejvíce endemické a problematické skupiny laktokokových bakteriofágů ve fermentačních zařízeních (Mahony a kol., 2012; Murphy a kol., 2016). Detekce přítomnosti bakteriofága 936 v mlékárenských a sýrařských provozech však ještě neznamená, že bude negativně ovlivněn vlastní fermentační proces. K problémům dochází až v případě, že nastane

lytický cyklus a bakteriofág se začne množit. Pro indikaci tohoto procesu pak nestačí pouhá detekce bakteriofága 936, ale musí se provést jeho kvantifikace. Metoda stanovení inhibice fermentace u vzorku podezřelého na přítomnost bakteriofága, při které se měří pokles tvorby kyseliny mléčné (titrační kyselost) ve srovnání s kontrolním vzorkem a při které je možné desítkovým ředěním stanovit titr bakteriofága (denzitu kontaminace bakteriofágem), je časově náročná a poskytuje pouze orientační údaje. V této certifikované metodice proto popisujeme moderní proces kvantifikace bakteriofága 936 molekulárně biologickou metodou zvanou real time PCR nebo též qPCR.

I. Cíl metodiky

Předkládaný metodický postup se zaměřuje na kvantitativní monitorování bakteriofága 936, jehož hostitelem jsou kmeny bakterie *Lactococcus lactis* používané pro výrobu sýrů. Infekce bakteriofágem 936 může vést ke zpomalené fermentaci nebo dokonce k úplnému selhání fermentace a následným ekonomickým ztrátám. Proto je žádoucí rychlá a citlivá metoda detekce a kvantifikace bakteriofága ve fermentovaných mléčných výrobcích. Cílem této metodiky je vypracování relativně rychlé metody kvantifikace bakteriofága 936 pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR), přičemž toto kvantitativní stanovení může být provedeno v kterékoliv fázi výroby mléčných produktů.

II. Vlastní popis metodiky

II. 1. Princip metody

Metoda kvantitativní PCR *(qPCR)* je moderní technika molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Metoda je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj (termocykler) umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního barviva, které se váže na syntetizovanou nukleovou kyselinu, a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované DNA. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikovaného produktu přítomného v reakční směsi. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Důležitá je přitom hodnota zvaná **CT** (*„threshold cycle"*), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný

fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce. Při detekci specifických úseků DNA se přímo stanovuje výchozí počet kopií cílových molekul, což je založeno na lineárním vztahu mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a C_T příslušné amplifikační křivky. Při amplifikaci vzorku o neznámé koncentraci studovaného organismu se současně amplifikuje diluční série standardů o známé koncentraci a z takto získané kalibrační přímky lze odečíst koncentraci DNA cíleného organismu v neznámém vzorku. Případný vznik nespecifických produktů lze detekovat na základě analýzy křivky tání vznikajícího PCR produktu. Využívá se přitom předpokladu, že nespecifické produkty mají odlišnou (obvykle nižší) teplotu tání T_m než produkty specifické. Jako tání DNA se označuje proces separace komplementárních řetězců dvouřetězcové DNA indukovaný zvyšováním teploty. Platí, že DNA taje nejrychleji v určitém rozsahu teplot blížících se právě teplotě tání T_m. Tání DNA se sleduje tak, že se roztok DNA ochladí na teplotu nižší než je očekávaná T_m produktů, pak se postupně ohřívá na teplotu vyšší, než je očekávaná T_m, a měří se přitom fluorescence. Vynesením naměřené intenzity fluorescence proti příslušné teplotě vzniká křivka tání, která strmě klesá v okolí T_m. Teplota v inflexním bodě křivky se pak rovná teplotě tání.

II. 2. Izolace DNA

Kvantitativní PCR je metoda molekulární biologie, která pracuje s DNA jako výchozím materiálem. Proto je nejprve třeba ze vzorků, u nichž má být stanoveno množství bakteriofága, izolovat DNA. K tomuto účelu byl použit komerční set DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Německo) a postupovali jsme podle instrukcí výrobce. Koncentrace DNA byla měřena na přístroji NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

II. 3. PCR primery a kvantitativní PCR (qPCR nebo real-time PCR)

Pro amplifikaci a kvantifikaci bakteriofága byly použity primery 936A – 936B o sekvenci 5′-ATCAGTTGGCTCAATGGAAGACCAAGCGG-3′ a 5′-GTTGCTTCTGCTGTTGGTGTCA AATGAGGA-3′, které amplifikují fragment genu pro hlavní strukturální protein (major structural protein) *msp* bakteriofága 936 (del Rio a kol., 2007). Pro amplifikaci úseku genu *msp* metodou real-time PCR byl použit přístroj Mx3005P (Stratagene, USA). Reakce probíhaly s použitím reakční směsi qPCR 2x SYBR Master mix (Top-Bio, ČR) a výše uvedených primerů v celkovém reakčním objemu 20 µl. Teplotní režim reakce byl následující: počáteční denaturace při 94°C (5 min), 35 cyklů denaturace při 94°C (45 s), nasedání primerů (annealing) při 58°C (1 min) a syntéza DNA při 72°C (1 min). Na konci syntézy DNA byla v každém cyklu změřena fluorescence barviv SYBR Green. Posledním krokem byla prodloužená polymerázová

reakce při 72°C (5 min). Srovnání rychlostí qPCR reakce (vyjádřené parametrem C_t „treshold cycle“) neznámého vzorku a standardu (odečet z kalibrační křivky) umožnilo stanovení množství bakteriofága 936 v testovaném vzorku. Pro qPCR byl použit vždy 1 µl DNA a všechny vzorky byly měřeny v triplikátech.

II. 4. Kalibrační křivka

Pro sestrojení standardní kalibrační křivky byl použit přímo bakteriofág 936 (DSM 10 567, izolát P008). Pro jeho namnožení byl použit kmen *Lactococcus lactis subsp. lactis* DSM 4366. Bakteriofág byl pomnožen a izolován dle přiložených instrukcí německé sbírky mikroorganismů DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Kalibrační křivka byla měřena v triplikátech s použitím sériově naředěného bakteriofága 936, který měl počáteční koncentraci DNA 90,6 ng/µl. Ze známé koncentrace bakteriofága a známého počtu bází cíleného genu, který činí 179 pb (viz obr. 1), byl vypočítán počet kopií v neředěném standardu podle následujícího vzorce:

$$\text{Počet kopií} = \frac{X\ \text{ng} \cdot 6{,}0221 \cdot 10^{23}\ \text{molekul/mol}}{N \cdot 660\ \text{g/mol} \cdot 1 \cdot 10^{9}\ \text{ng/g}}$$

X = množství amplikonu (ng)

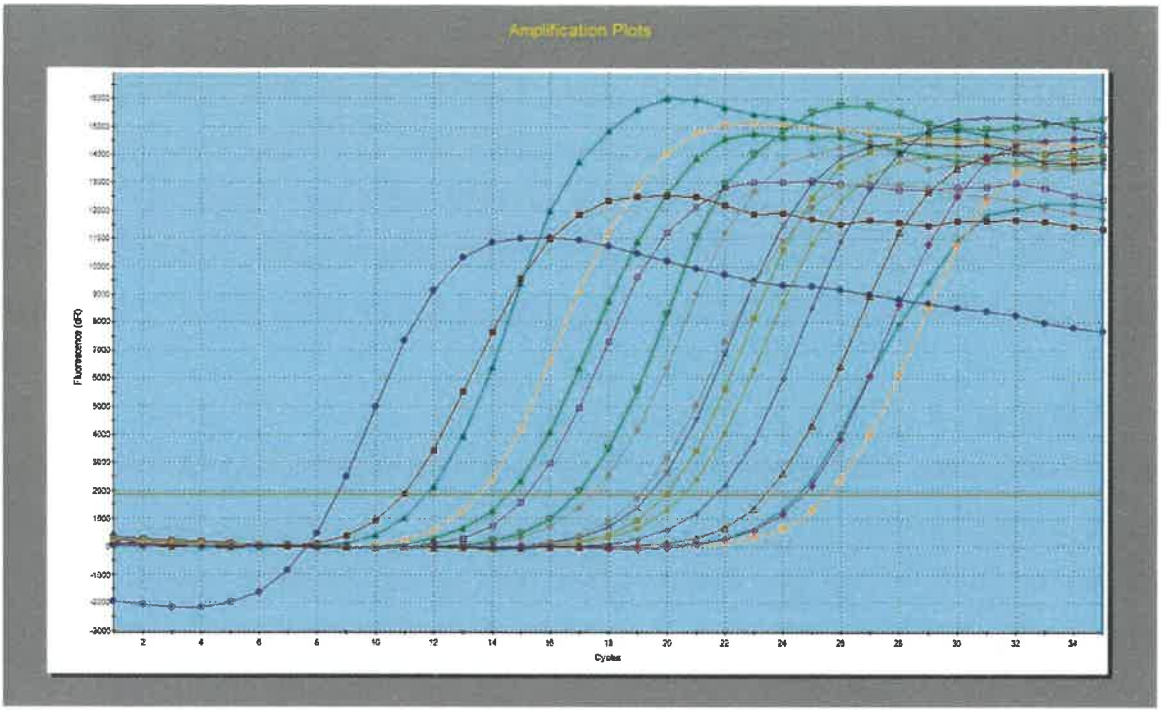
N = délka DNA amplikonu

660 g/mol = průměrná hmotnost jedné báze dvouřetězcové DNA

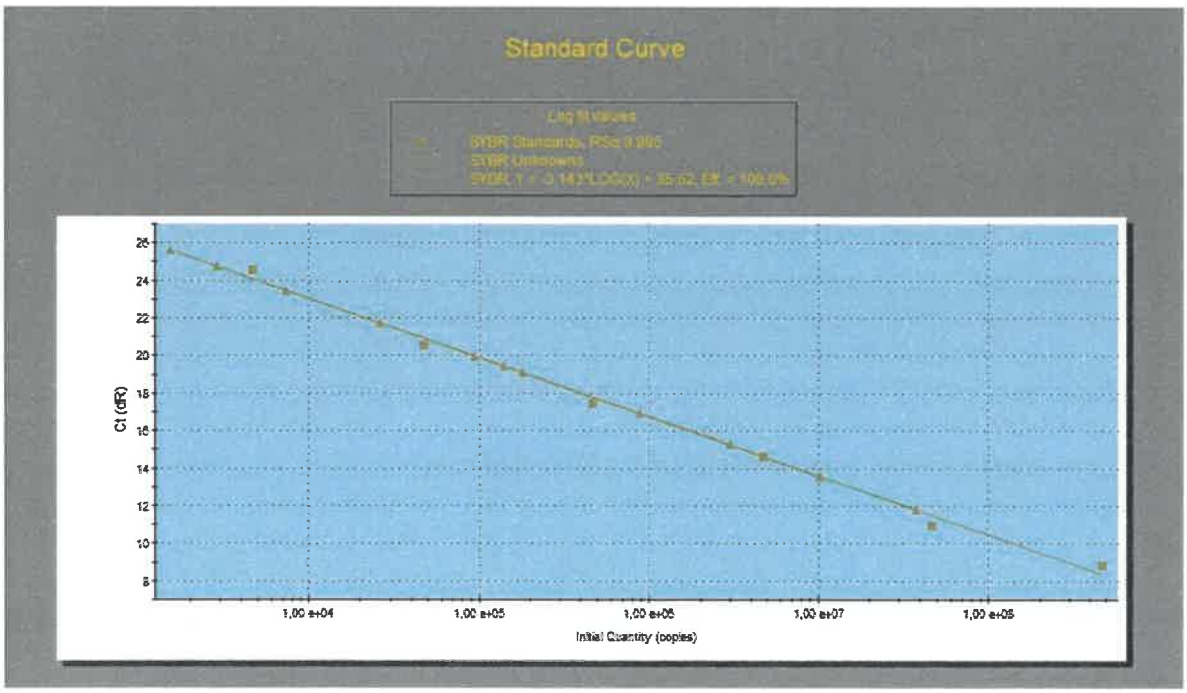
S použitím tohoto vzorce bylo spočítáno, že výchozí neředěný standard bakteriofága obsahuje $4{,}71 \cdot 10^{11}$ kopií genu *msp*. Standardní křivka vznikla sériovým naředěním bakteriofágové DNA v rozmezí 10^{-1} až 10^{-10}. Pro každé ředění byla provedena qPCR (viz obr. 2) a hodnoty C_T (treshhold cycle) byly vyneseny proti počtu kopií genu *msp*. Směrnice (sklon) křivek měl pro primery 936A-B hodnotu -3,143. Úspěšnost amplifikace byla v testovaném rozsahu ředění 108%. Koeficient determinace (R^2) měl hodnoty 0,995, což ukazuje na velmi malý rozptyl bodů kalibrační přímky, jak je ukázáno na obr. 3

TCAATGGAAGACCAAGCGGAGACTAACAGCTATCCAGCTGATGACGTGCCAGA
CCATGGAGTGAAAAAAGGTGCTACCTTACTTCAAGGCGAAATGGTATTCATTCAA
ACAGACCAAGCACTTAAAGAGGATATGCTAGGGCAACAAAGAACAGAAAATGGC
TTGGGTTGGTCTCCTAC

Obr.1. Sekvence úseku genu msp bakteriofága 936



Obr. 2. Amplifikační křivky průběhu qPCR vyjadřující závislost počtu cyklů Ct na intenzitě fluorescence.



Obr. 3. Kalibrační křivka pro kvantifikaci bakteriofága 936

II. 5. Ověření metody na experimentální sadě vzorků

Metodika byla aplikována na vzorky odebrané z mlékárny, přičemž vzorky některých mléčných meziproduktů vykazovaly problémy při fermentaci. Seznam vzorků je uveden v tabulce 1. Vzorky spolu nijak nesouvisí a byly vybrány pouze pro demonstraci fungování metodiky. Jako negativní kontrolní vzorek byl použit kmen *Lactobacillus helveticus* 66, neboť tento druh není hostitelem pro bakteriofága 936. Dalším negativní kontrolu představoval kmen *Lactococcus lactis* 731, u kterého nebyl metodou PCR detekován bakteriofág 936. Jako pozitivní kontrola byl do testování metodiky zařazen kmen *Lactococcus lactis* 416, u kterého byl metodou klasické PCR detekován pozitivní signál pro bakteriofága 936, avšak kmen vykazoval normální fermentační aktivitu, bakteriofág 936 tedy byl ve formě profága. Ze vzorků byla izolována DNA (postup dle bodu II.2), která byla podrobena qPCR metodě za účelem kvantifikace fága 936 (postup dle bodu II.3). Všechny vzorky byly testovány v triplikátech. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1. Kvantifikace bakteriofága 936 ve vybraných vzorcích

Číslo vzorku	Popis vzorku	Koncentrace DNA [ng/µl]	Počet kopií fága 936/µl DNA vzorku	Počet kopií fága 936/ng DNA vzorku
Lh 66	*Lactobacillus helveticus*	173,5	$8{,}35.10^{1}$	$4{,}81.10^{-1}$
Ll 731	*Lactococcus lactis*	66,8	$2{,}1.10^{3}$	$3{,}14.10^{1}$
Ll 416	*Lactococcus lactis*	85	$3{,}65.10^{6}$	$4{,}3.10^{4}$
11/2	*Syrovátka tvaroh*	3	$4{,}27.10^{5}$	$1{,}42.10^{5}$
22	*Syrovátka tvaroh*	0,6	$3{,}79{,}10^{7}$	$3{,}32.10^{7}$
16	*Zákys sýr*	4,3	$1{,}02.10^{7}$	$2{,}37.10^{6}$
2/2	*Syrovátka sýr*	2,1	$6{,}89.10^{2}$	$3{,}28.10^{2}$
15/1	*Syrovátka sýr*	1,8	$7{,}59.10^{2}$	$4{,}22.10^{2}$

III. Srovnání novosti postupů a jejich zdůvodnění

Metodika je zaměřena na kvantifikaci bakteriofága 936, který je nejrozšířenějším virem ve výrobních provozech (Oliveira a kol. 2017). Novost metodiky spočívá v tom, že využívá technik molekulární biologie, a je tudíž nezávislá na kultivaci bakteriofága. Protože virulentní mléčné bakteriofágy mají úzký hostitelský rozsah, není praktické používat kultivační testy k jejich detekci v různých mléčných výrobcích a provozních prostředích. Navíc bakteriofágy mohou měnit a ztrácet infekčnost při odběru vzorků a při zpracování vzorku pro kultivaci.

Inovace a výhody této metodiky spočívají v řadě aspektů. Metody molekulární biologie nezávislé na infekčnosti bakteriofágů a bakteriálních hostitelů, mohou být aplikovány v kterémkoliv kroku fermentačního procesu. Může tak být v případě problémů zjištěno ohnisko infekce, jakož cesty jejího šíření v mlékárenských provozech, kde jsou kontaminace zdroje a trasy šíření informací nesnadno identifikovatelné, a proto je třeba zkontrolovat několik kontrolních bodů. Předností metody je také její relativní rychlost, výsledky lze naměřit v řádu hodin, a vysoká citlivost. Metodika využívá ověřených primerů 936A-B (del Rio a kol., 2007), které však byly v citované práci použity pouze pro detekci bakteriofága 936 tradičním PCR postupem, nikoliv pro jeho kvantifikaci. Za účelem kvantifikace bylo nutno připravit sérii standardů o známé koncentraci bakteriofága 936 a sestrojit standardní křivku vyjadřující vztah Ct hodnoty vzhledem ke vstupní DNA. Kalibrační křivku naměřenou v této metodice lze prostřednictvím rovnice kalibrační přímky, která má v tomto případě tvar Y = -3,143. LOG(X) + 35,62, kde X představuje naměřené hodnoty C_T, přímo využít pro kvantifikaci bakteriofága 936, aniž by bylo nutno znovu provádět qPCR s bakteriofágem 936. U výsledků uvedených v tabulce 1 je zřejmé, že kvantifikace bakteriofága závisí na koncentraci DNA, potažmo tedy na množství bakterií ve vzorku. Jako detekční limit lze považovat počet kopií bakteriofága ve vzorku, které nepřesáhnou hodnoty 10^3 - 10^4. Tyto hodnoty upozorňují na přítomnost bakteriofága, avšak neindikují jeho infekčnost. Hodnoty nad tímto limitem pak lze považovat za indikaci infekčnosti bakteriofága. Virulentní bakteriofág 936 bakterií mléčného kvašení stále představuje vážnou hrozbu pro průmyslové fermentace. Přes řadu opatření, která provádí každý výrobní provoz za účelem omezení tohoto problému, se bakteriofágy vyvíjejí, dochází k mutacím a objevují se stále nové varianty. Proto tato metodika může nalézt významné uplatnění ve fermentačních provozech a včasně identifikovat možné problémy.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro monitoring výskytu bakteriofága 936 v mlékárenských vzorcích, a to jak v surovinách, meziproduktech a finálních výrobcích (fermentovaných mléčných výrobcích, sýrech, syrovátkových nápojích apod.), tak v zákysových kulturách (matečné kultury, ready-to-use kultury, DVS kultury, provozní zákysy apod.), stejně tak jako v prostředí mlékárenských provozů (povrchy pomůcek a technologických zařízení, ovzduší, odpadní vody apod.). Nalezne tedy uplatnění jak na mlékárenských provozech, tak u výrobců zákysových kultur. Vzhledem k tomu, že ne všichni tito uživatelé disponují vybavením pro provádění PCR analýz, očekávat lze, že si toto analýzy budou zadávat v poradenských laboratořích, která toto vybavení mají.

Proto byl jako modelový uživatel vybrán uživatel MILCOM a.s., kterému byla tato metodika předána na základě smlouvy o uplatnění metodiky. MILCOM a.s. mj. poskytuje poradenství a služby mlékárenským podnikům a vyrábí zákysové kultury a pomocné látky pro oblast mlékárenství.

V. Ekonomické aspekty

Pro laboratoř vybavenou pro provádění PCR analýz se náklady na zavedení této metodiky pohybují v řádu stovek až tisíců korun, a to na nákup primerů, standardů, aj. reagencií. Pokud se jedná o laboratoř, která tyto analýzy poskytne formou služby, jsou její tržby odhadovány v řádu desítek tisíc korun ročně. Např. při analýze 50 vzorků ročně jsou tržby odhadovány na 50 tis. Kč za rok a zisk na 5 tis. Kč za rok. Za pět let to činí tržby cca 250 tis. Kč a zisk cca 25 tis. Kč.

Významnější ekonomický přínos se týká koncových uživatelů, tj. výrobních podniků. Jestliže využití metodiky přispěje k nalezení a následné eliminaci zdroje bakteriofága v mlékárenském provoze, zamezí se tím ztrátám v důsledku nutnosti likvidace neprokysávajících výrobních šarží. V rámci ČR použití této metodiky zamezí nutnosti likvidace výrobních šarží z odhadem 30 výrobních dní ročně a z toho plynoucí ztrátě tržeb cca 30 mil. Kč, resp. ztrátě zisku cca 1,5 mil. Kč ročně. Za bilanční období 5 let to činí odhadem zamezení ztrátě tržeb 150 mil. Kč, resp. ztrátě zisku 7,5 mil. Kč.

Pro výrobce zákysových kultur využití této metodiky přispěje k zamezení ztrátám v důsledku ztráty důvěry mlékárenských podniků, a to jak oprávněné (kontaminace kultury bakteriofágem u výrobce kultury), tak neoprávněné (kontaminace bakteriofágem až na provoze mlékárny). Hrubým odhadem to může pro výrobce kultury znamenat zamezení ztrátám tržeb 1,5 mil. Kč a zamezení ztrátám zisku 75 tis. Kč ročně. To za bilanční období 5 let obnáší zamezení přibližným ztrátám 7,5 mil Kč z tržeb a 375 tis. Kč ze zisku. Tento odhad vychází z průměrné ceny zákysové kultury 1 tis. Kč pro naočkování 5 tis. litrů mléka.

VI. Seznam použité literatury

del Rio B., Binetti A. G., Martín M. C., Fernández M., Magadán A. H., Alvarez M. A. 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. Food Microbiol. 24:75-81.

Fliegerová K., Mrázek J., Kavková M., Marková J., Křepelková M., Němečková I., Kopečný J. 2017. Přirozené systémy ochrany proti bakteriofágům u bakterií mléčného kvašení. Mlékařské listy 28 (4): 21-24.

Mahony J., Murphy J., van Sinderen D. 2012. Lactococcal 936-type phages and dairy fermentation problems: from detection to evolution and prevention. Front. Microbiol. 3:335.

Murphy J., Bottacini F., Mahony J., Kelleher P., Neve H., Zomer A., Nauta A., van Sinderen

D. 2016. Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal Siphoviridae phages. Sci. Rep. 6:21345.

Oliveira J., Mahony J., Hanemaaijer L., Kouwen T., van Sinderen D. 2017. Biodiversity of bacteriophages infecting Lactococcus lactis starter cultures. J. Dairy Sci. 101:96–105.

Šilhánková L. Mikrobiologie pro potraviná̌e a biotechnology. Praha, Victoria Publishing, 1995. 99-100. ISBN 80-85605-71-6

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Fliegerová K., Mrázek J., Kavková M., Marková J., Křepelková M., Němečková I., Kopečný J. 2017. Přirozené systémy ochrany proti bakteriofágům u bakterií mléčného kvašení. Mlékařské listy 28 (4): 21-24.

Mrázek J., Fliegerová K., Křepelková M., Marková J., Horáčková Š., Havlíková Š., Němečková I., Kopečný J. 2017. Anti-phage defensive mechanisms of dairy bacteria. International Symposium on Anaerobic Microbiology, 11-14. 6. 2017, Liblice, Czech Republic.

VIII. Přílohy, dokumenty a doklady

☐ Smlouva s uživatelem - MILCOM a.s., Praha

☐ Posudek odborníka - Prof. MVDr. Vladimír Kmeť, DrSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice, Slovenská republika

☐ Posudek ze státní správy - MVDr. Jiří Hlaváček, Státní veterinární správa, Praha

☐ Osvědčení odborného orgánu státní správy

V Praze dne .....

Za zhotovitele: Ing. Jan Kopečný, DrSc. .....

Certifikovaná metodika vznikla s finanční podporou NAZV, č. projektu QJ1510338 v programu KUS.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., v Praze
Laboratoř anaerobní mikrobiologie

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha