

UMĚLÉ NOSY PŘI DETEKCI PLÍSNÍ A MYKOTOXINŮ

^{1, 2, 3}Vlastimil DOHNAL, ¹Andrea SLÁDKOVÁ, ^{2, 4}Kamil KUČA, ^{2, 4}Daniel JUN

¹Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Brno

²Univerzita obrany, katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

³Univerzita J. E. Purkyně, katedra chemie Přírodovědecké fakulty, Ústí nad Labem

⁴Univerzita obrany, Centrum pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

Souhrn

V současné době patří produkce zdravotně nezávadných potravin mezi priority každého vyspělého státu. Odhaduje se, že více než 25 % celosvětové produkce potravinářských plodin je zlikvidováno v důsledku napadení fusáriovými plísněmi. Kontaminace rostlinného materiálu (krmiv, potravin) toxinogenními houbami je nebezpečná z několika hledisek. Jednak mohou houby vytvářet dráždivé těkavé metabolity, toxické látky nebo spóry vyvolávající u některých citlivějších jedinců alergii. Napadené potraviny či krmiva mívají zpravidla nižší nutriční hodnotu a dochází u nich například ke snižování obsahu využitelných bílkovin a sacharidů. Produkce mykotoxinů však patří mezi nejzávažnější důsledky fungálního znečištění. Jednou z možností rychlé detekce fungální kontaminace potravin jsou i umělé nosy.

Klíčová slova: Mykotoxiny; Plísně; Umělý nos; Umělé neuronové sítě.

Artificial Noses in Detection of Moulds and Mycotoxins

Summary

The production of safety food is the priority of developed countries. More than 25 % of worldwide production of cereals is contaminated with *Fusarium* fungi. Spoiled food/feed has a lower nutritional quality and also negative health effects. Fungi produce irritating volatile compounds, toxic compounds (mycotoxins) and allergizing spores. The most important metabolites from the toxicological point of view are mycotoxins. Several analytical methods are used for the detection of moulds in food/feed, urban dust or environmental samples. One of the most perspective methods is artificial nose which combines measurement using sensor array and signal evaluation using chemometrical methods, for example artificial neural networks.

Key words: Mycotoxins; Fungi; Artificial nose; Artificial neural networks.

Mykotoxiny a těkavé látky

Mykotoxiny jsou toxickými sekundárními metabolity vláknitých hub. Z chemického i toxikologického hlediska se jedná o velmi různorodou skupinu látek, negativně ovlivňujících zdraví lidí i zvířat (vyvolávají onemocnění souhrnně nazývaná mykotoxikózy). Přítomnost těchto toxických látek bývá doprovázena charakteristickými těkavými i netěkavými metabolity jejich producentů. Některé z nich je možné využít jako indikátory fungálního znečištění. I když takové těkavé látky dávají vzorkům často velmi špatnou vůni, nemusí jejich přítomnost ještě být známkou přítomnosti mykotoxinů.

Vztah mezi vůní a jejím chemickým složením není dosud kompletně vysvětlen (23). Například typ těkavých látek produkovaných houbou *Beauveria*

bassiana (producent mykotoxinu beauvericinu) závisí na druhu látek, ze kterých získávají uhlík. Tato entomopatogenní houba se běžně vyskytuje v půdách. Pro svůj růst může kolonizovat rostliny i čelovce. Napadený hmyz po velkém nárůstu hyf, jež vyplní tělo hostitele a spotřebují jeho živiny, později umírá. Toho se komerčně využívá při regulaci populací hostitelského hmyzu, například kůrovců na Šumavě. Získává-li tato houba uhlík z glukózy, vznikají ve velké míře etanol, deriváty naftalenu a seskviterpeny, jsou-li zdrojem uhlíku alkany, jsou produkovány n-dekan a diisopropylnaftalen. Uhlovodíky s dlouhým řetězcem jsou degradovány pravděpodobně beta-oxidací na oxid uhličitý (8). Pro detekci a kvantifikaci těkavých metabolitů plísní lze s výhodou použít i zařízení zvaná „umělé nosy“, respektive „umělé jazyky“.

Umělý nos a jazyk

Každé takové zařízení sestává ze dvou základních částí – zdroje signálu a jednotky, kde je signál zpracováván. Zdrojem signálu může být jednoduchý senzor či pole senzorů nebo složitější analytický přístroj, jakým je například chromatograf. Získaný signál je vyhodnocován nejčastěji vícerozměrnými statistickými metodami – metoda hlavních komponent (principle component analysis, PCA), metoda parciálních nejmenších čtverců (partial least-squares, PLS), multilineární regrese (multilinear regression, MLR). V posledních letech zde nacházejí uplatnění i metody umělé inteligence – umělé neuronové sítě a expertní systémy.

Jedním z prvních pokusů nahradit lidský čich byla detekce plísní v obilninách. Do té doby bylo například hodnocení kvality obilí podle vůně výhradně doménou k tomu vyškolených inspektorů. Například v USA bylo rozlišováno šest typů vůní: dobrá (good), zatuchlá (musty), plesnivá (mouldy), hmyzí (insect), kyselá (sour) a spálená (burnt). U všech vůní byly též rozlišovány tři stupně intenzity. Avšak inhalace fugálních spór z kontaminovaných vzorků obilí může vést u exponovaných osob k poškození dýchacích orgánů (25).

Nověji navržené postupy byly založeny na instrumentálních metodách – plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí a kvantifikací několika málo vybraných těkavých metabolitů (7). V současnosti jsou sice tyto přístroje dostupné také v mobilní verzi, ale nebývají běžně využívány k tomuto účelu. Jejich nevýhodou je jednak relativně vysoká finanční náročnost, ale i technická složitost instrumentace. Proto vývoj směřuje k detektorům založeným na (bio)senzorech. Zde je možné zaregistrovat posun od selektivní detekce (používané např. v instrumentálních metodách, kde je znám analyt, který kvantifikujeme, nebo pole selektivních senzorů) směrem k neselektivní detekci. Nevýhodou běžně používaných senzorů je ovlivnění signálu vlhkostí (například skrze ovlivnění vodivosti) (18).

Generace signálu – senzory

Jak již bylo zmíněno výše, v počátku svého vývoje byly i umělé nosy založeny na selektivních senzorech. Každá jednotlivá látka byla detekována jedním chemicky velmi specifickým senzorem. Limitujícím faktorem takového řešení je schopnost

měřit pouze omezený počet látek a tím i omezení použitelnosti konkrétního pole senzorů na velmi malý počet aplikací. Navíc pro některé látky je velmi obtížné vytvořit dostatečně citlivý a selektivní senzor (16). Získané výsledky jsou velmi často těžko korelovatelné se sensorickými vlastnostmi vzorku.

Nedostatky umělých nosů spojené s použitím polí selektivních detektorů řeší aplikace neselektivních senzorů a následné vyhodnocení dat pomocí chemometrických metod. Měření jsou rychlá (výsledky lze získat prakticky okamžitě), reprodukovatelná a objektivní. Také s interpretací nebývají zpravidla problémy. Jednou z mála potíží, které se u těchto typů senzorů vyskytují, je jejich limitovaná míra neselektivity. Obdobně jako u selektivních senzorů i zde nemusí dojít k pokrytí detekce celého spektra sensoricky důležitých těkavých látek, což vede ke zredukování počtu skutečně „aktivních“ senzorů. Nastalá situace pak vede k nepoužitelnosti daného pole senzorů pro konkrétní aplikaci (2). Koncept vychází z poznatků funkce jejich biologické předlohy. Savčí čichové orgány se skládají z velkého počtu semiselektivních čichových receptorů (senzorů). Receptory se liší v selektivitě i v síle odezvy na danou látku. Signál získaný z receptorů je následně vyhodnocen nervovým systémem.

Vysoký počet nesespecifických receptorů vytváří signál, který má charakteristický průběh (pattern) pro každou jednotlivou vůni. Tento fenomén, zvaný „distribuovaná specifita“, je základem vysoké kapacity savčího čichového smyslu. Průběh signálu může být zapamatován a vůně pak rozpoznávána. Analogicky, umělý nos sestává z nesespecifických (cross-reaktivních) chemických senzorů. Do určité míry zvýšení neselektivity senzorů vede k rozšíření skupiny detekovatelných chemických látek. Signál je pak zpracováván programem pro rozpoznávání vzorů (pattern recognition) (20). Takovým softwarem mohou být například umělé neuronové sítě (5).

Senzory mohou být založeny na různých fyzikálních či chemických principech. Nejčastěji jsou to MOSFET tranzistory (metal-oxide-silicon field-effect transistor), které slouží pro detekci těkavých redukcujících látek (sirovodík, alkoholy apod.), interagujících s kyslíkem sorbovaným na povrchu senzoru. Měření je založeno na sledování zvýšení vodivosti senzoru vyvolaného snížením množství sorbovaného kyslíku. Citlivost a selektivitu senzoru lze ovlivnit teplotou, tloušťkou kovové vrstvy a samozřejmě i volbou druhu kovu. Nevýhodou MOSFET

je ireverzibilní interakce (tzv. otravy) se sloučeninami síry a slabými kyselinami. Dalšími běžnými druhy senzorů jsou například vodivé polymery, piezoelektrické a optické senzory. Více o jednotlivých typech senzorů například v review (3, 24).

Předzpracování signálu

Signál senzorů bývá odečítán zpravidla v ustáleném rovnovážném stavu (steady-state), a je tak časově nezávislý. Před vlastní klasifikací je surový signál zbaven šumu a jeho intenzita upravena na přijatelnou úroveň (tzv. normalizace). Krok normalizace je nutný k tomu, aby výsledek klasifikace nebyl ovlivněn koncentrací analytu. Zároveň jsou vyloučena měření, jež obsahují anomálie, čímž rozumíme např. nestabilitu signálu, žádný signál apod.

Vyhodnocení signálu umělého nosu

K vyhodnocování signálu umělého nosu se používají buď lineární statistické metody, jako jsou metoda parciálních nejmenších čtverců (partial least squares, PLS) či častěji používaná lineární diskriminantní analýza (linear diskriminant analysis, LDA) nebo statistické metody nelineární (4). Vzhledem k tomu, že odezva senzorů bývá spíše nelineární, jeví se nelineární metody jako vhodnější. K těm patří především kvadratická diskriminantní analýza (quadratic diskriminant analysis, QDA) a v poslední době i umělé neuronové sítě (artificial neural network, ANN) (5, 12).

ANN tvoří rozsáhlou skupinu výpočetních nástrojů založených na paralelně distribuovaných procesech. Ve své podstatě vycházejí z poznatků o fungování lidského mozku, proto i terminologie používaná v této oblasti má hodně společných výrazů. ANN jsou složeny ze vzájemně propojených výpočetních jednotek (tzv. umělých neuronů, artificial neuron, AN), nejčastěji uspořádaných do vrstev. Vysoký počet AN a možných propojení mezi nimi poskytuje prakticky neomezený počet možností, jak je uspořádat. Takový organizovaný soubor AN tvoří tzv. architekturu sítě. Více informací lze nalézt v přehledových článcích (9, 10).

I umělé neurony ve své funkci kopírují ty fyziologické. Stejně jako biologických je i umělých neuronů celá řada. Ve většině typů umělých neuronů dochází nejprve k součtu vážených vstupů, což

jsou buď přímo normalizované naměřené hodnoty signálu senzorů, anebo výstupy z AN předchozí vrstvy. Překročí-li součet vážených vstupů určitou mez, šum (někdy označováno jako prahová hodnota), dojde k jeho transformaci pomocí takzvané přechodové funkce na výstupní signál, který je dále paralelně distribuován váženými spojeními do dalších AN.

Aplikace ANN v jakémkoli odvětví sestává ze dvou hlavních kroků. Na začátku je potřeba zvolit vhodnou architekturu sítě, tj. počet umělých neuronů, jejich vzájemné vážené propojení, a nastavit výpočetní charakteristiky sítě – optimalizace všech proměnných a výběr vhodné přechodové funkce AN. Komplexita použité architektury ANN je dána především typem a složitostí řešené problematiky. Čím více nezávislých proměnných je třeba brát v úvahu, tím složitější a rozsáhlejší bude optimální architektura sítě. Díky paralelní distribuci při zpracování dat existuje pro jednu konkrétní aplikaci prakticky neomezený počet ANN popisujících danou úlohu (10).

Nastavení všech proměnných v ANN není v lidských silách a tento proces je automatizován. Slouží k němu tzv. adaptační algoritmy. Podle charakteru řešeného úkolu se dělí na dvě skupiny. Algoritmy z první skupiny pracují tak, že hledají vztah (respektive model) spojující dvě skupiny dat. Je to tzv. učení s učitelem (supervised adaptation). V případě elektronických nosů se jedná zejména o kvantifikaci – vyjádření koncentrace dané látky či intenzity vůně. Do druhé skupiny algoritmů se řadí ty, které pracují pouze s jednou skupinou dat (unsupervised adaptation). Tyto algoritmy dokáží klasifikovat jednotlivá měření v souboru dat podle jejich vnitřní struktury. Takto adaptované ANN pak nacházejí uplatnění například při hodnocení kvality obilí (14).

Pro vytvoření dobrého modelu je třeba zajistit dostatek relevantních dat získaných proměřením dostatečného počtu vzorků postihujících prakticky všechny typy vzorků, které přicházejí v úvahu. Správnost modelu lze zaručit tehdy, je-li původní soubor rozdělen na dvě až tři části. Jedna část takto děleného souboru slouží k adaptaci, druhá k verifikaci správného průběhu adaptace a třetí k otestování správnosti modelu. V případě uspokojivých odchylek mezi naměřenými hodnotami a hodnotami vypočtenými modelem pro všechny tři soubory dat lze tento model považovat za správný. Takový model je již možné aplikovat na vzorky, které nebyly sou-

částí žádného souboru dat použitého při vývoji modelu. Značnou výhodou ANN je možnost aktualizace a zpřesňování modelů (11).

Aplikace elektronických nosů v detekci plísní, respektive mykotoxinů

Elektronické nosy jsou velmi užitečnými zařízeními s širokou škálou aplikací, jako je rozlišování parfémů, pálenek, pív, tabákových výrobků, analýza mletého masa (26), obilnin (17), sýrů a jiných mléčných produktů (3), potravin i krmiv (16, 22). Uplatňují se také při řízení kvasných procesů, sledování čistoty chemikálií, analýze směsí a dokonce i v medicínské diagnostice (analýza dechu).

Jak již bylo zmíněno, jsou některé primární či sekundární metabolity plísní těkavými látkami. Patří mezi ně zejména produkty tvořené z aminokyselin, sacharidů či mastných kyselin, jako jsou nižší sekundární alkoholy a methylketony. Na složení těkavých látek má vliv nejen substrát (8), ale i kmen plísně (27). Byly například prokázány rozdíly mezi toxikogenními a netoxikogenními kmeny plísně *Aspergillus flavus*, která produkuje mimo jiné i karcinogenní aflatoxiny. U některých fuzariových plísní byl detekován těkavý terpen trichodien, sloužící jako prekurzor biosyntézy trichothecenových mykotoxinů (13). Mezi trichothecenovy patří například v obilí se často vyskytující deoxynivalenol, ale i potenciálně bojově zneužitelný T-2 toxin. K detekci trichodienu však byla využita plynová chromatografie. Obdobně plísně rodu *Penicillium* mohou být detekovány na základě nejvíce zastoupeného metabolitu 3-oktanonu (15).

Detekce polem senzorů není tak selektivní jako chromatografické metody a vede většinou pouze k závěru, zda zkoumaný vzorek je kontaminován plísněmi, eventuálně jak mnoho, a nevypovídá zpravidla nic o možnosti výskytu mykotoxinů.

Vlastní kalibrace elektronického nosu například na výskyt plísní v obilí bývá zpravidla provedena na souboru vzorků, které představují možné experimentální podmínky: různé vlhkosti substrátu a různé stupně zaplísnění. Do kalibrace bývají zahrnuty jak čisté nezaplísněné obilí, tak i přírodně či uměle inokulované (4, 1).

Jonsson a spol. (14) použili ke klasifikaci získaných signálů supervised ANN s nejběžnějším adaptačním algoritmem zpětného šíření chyb (back propagation, BP). ANN sestávala z umělých neuro-

nů uspořádaných do tří vrstev – 15 AN ve vstupní vrstvě, kde každý z nich sloužil ke vstupu signálu jednoho z 15 senzorů. Druhá vrstva s 10 AN sloužila k výpočtům a třetí byla výstupní. ANN klasifikovala s velkou úspěšností vzorky obilí do čtyř kategorií – dobré, slabě či více zatuchlé a plesnivé. Získaný model byl schopen odhadnout počet kolonie tvořících jednotek (colony forming unit, CFU).

Olsson a spol. (18) provedli mimo jiné i klasifikaci obilí na základě měření těkavých látek, při kterém porovnali obě metody – plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí a elektronický nos sestávající z 10 MOSFET senzorů. Naměřená data byla vyhodnocována multivariacními chemometrickými metodami, jako je metoda hlavních komponent, metoda parciálních nejmenších čtverců (PLS), PLS-diskriminační analýza a SIMCA (soft-independent modelling of class analogy). U výsledků získaných pomocí pole senzorů byla zaznamenána vyšší úspěšnost klasifikace. Obdobných výsledků bylo dosaženo při studiu výskytu mykotoxinu ochratoxinu A a deoxynivalenolu v ječmeni (19).

Solis a spol. (21) se úspěšně pokusili obejít problém s fluktuací hodnoty vodivosti senzoru (vlivem vody a dalších vodivých látek). Při ochlazení senzoru pod teplotu disociace O_2^- zůstanou ionty O^- „zmrazeny“ po dlouhou dobu na povrchu polovodiče. Experiment tedy probíhá tak, že na počátku je senzor ohřát na provozní teplotu (200–400 °C), vystaven působení vzorku po krátkou dobu, tak jako při běžném postupu. Teprve potom je provedeno vlastní měření.

Při experimentech se vzorky plísní pěstovaných v médiu byla pozorována pozitivní korelace mezi množstvím těkavých látek a ergosterolem, který v některých případech slouží pro účely kvantifikace hub (6).

Závěr

Kromě jiných metod lze k detekci přítomnosti plísní ve vzorcích využít analýzu těkavých látek, jež jsou plísněmi produkovány. K identifikaci těchto těkavých látek slouží v současné době nejčastěji plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Ta má sice nižší limity detekce a větší selektivitu než umělé nosy, ale toto měření je časově i finančně daleko nákladnější. Umělé nosy lze po příslušné kalibraci využít i při rutinní analýze. K jejímu vyhodnocení (respektive vyhodnocení naměřených sig-

nálů) jsou pak využívány multivariační statistické metody. V posledních letech jsou stále více aplikovány i umělé neuronové sítě. Spojení těchto dvou technologií se do budoucnosti jeví jako perspektivní.

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci grantového projektu Ministerstva průmyslu a obchodu ČR: 2A-1TP1/009.

Literatura

1. ABRAMSON, D., et al. Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. *J. Stored Products Research*, 2005, vol. 41, no. 1, p. 67–76.
2. AISHIMA, T. Correlating sensory attributes to gas chromatography–mass spectrometry profiles and e-nose responses using partial least squares regression analysis. *J. Chromatogr. A*, 2004, vol. 1054, p. 36–46.
3. AMPUERO, S. – BOSSET, JO. The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B: Chemica*, 2003, vol. 94, no. 1, p. 1–12.
4. BALASUBRAMANIAN, S., et al. Evaluation of an artificial olfactory system for grain quality discrimination. *LWT – Food Science and Technology*, 2007, vol. 40, no. 10, p. 1815–1825.
5. BOGER, Z. Selection of quasi-optimal inputs in chemometrics modeling by artificial neural network analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 490, no. 1/2, p. 31–40.
6. BORJESSON, T. – STOLLMAN, U. – SCHNURER, J. Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, vol. 58, p. 2599–2605.
7. BORJESSON, T. Volatile fungal metabolites as indicators of mould growth in stored cereals. Dissertation, Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, 1993, p. 44.
8. CRESPO, R., et al. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol. Res.*, in print.
9. DOHNAL, V. – KUČA, K. – JUN, D. Metody umělé inteligence: Nový trend ve farmacii. *Česká a slovenská farmacie*, 2005a, roč. 54, č. 4, s. 163–167.
10. DOHNAL, V. – KUČA, K. – JUN, D. What are artificial neural networks and what they can do? *Biomed. Pap.*, 2005b, vol. 149, no. 2, p. 221–224.
11. DOHNAL, V., et al. Quantitative analysis of chiral compounds from unresolved peaks in capillary electrophoresis using multivariate calibration with experimental design and artificial neural networks. *Chirality*, 2002, vol. 14, p. 509–518.
12. HAUGEN, JE. – KVAAL, K. Electronic nose and artificial neural network. *Meat Science*, 1998, vol. 49, Supp. 1, p. S273–S286.
13. JELEN, HH., et al. Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, p. 3815–3820.
14. JONSON, A., et al. Electronic nose for microbial quality classification of grains. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, vol. 35, p. 187–193.
15. LARSEN, TO. – FRISVALD, JC. Characterisation of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycol. Res.*, 1995, vol. 99, p. 1153–1166.
16. LUNDSTROM, I., et al. From hydrogen sensors to olfactory images – twenty years with catalytic field-effect devices. *Sensors Actuators B*, 1993, p. 13–14; 16–23.
17. MAGAN, N. – EVANS, P. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, 2000, vol. 36, no. 4, p. 319–340.
18. OLSSON, J., et al. Volatiles for mycological quality grading of barley: determination using gas chromatography–mass spectrometry and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, vol. 59, p. 167–178.
19. OLSSON, J., et al. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, vol. 72, p. 203–214.
20. PEARCE, TC. Computational parallels between the biological olfactory pathway and its analogue “The Electronic Nose”: Part II. Sensor-based machine olfaction. *Biosystems*, 1997, vol. 41, no. 2, p. 69–90.
21. SOLIS, JL., et al. Identifying natural and artificial odours through noise analysis with a sampling-and-hold electronic nose. *Sensors and Actuators B*, 2001, vol. 77, p. 312–315.
22. SCHNURER, J. – OLSSON, J. – BORJESSON, T. Fungal volatiles as indicator of food and feeds spoilage. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, vol. 27, p. 209–217.
23. SMITH, EA. – CHAMBERS, IV E. – COLLEY, S. Development of vocabulary and references for describing off-odours in raw grains. *Cereal Foods World*, 1994, vol. 39, p. 495–499.
24. SNOPOK, BA. – KRUGLENKO, IV. Multisensor systems for chemical analysis: state-of-the-art in Electronic Nose technology and new trends in machine olfaction. *Thin Solid Films*, 2002, vol. 418, no. 1, p. 21–41.
25. WALINDER, R. – NORBACK, D. – JOHANSSON, G. Pulmonary reactions after exposure to 3-methylfuran vapour, a fungal metabolite. *Int. J. Tubercul. Lung Dis.*, 1998, vol. 2, p. 1037–1039.
26. WINQUIST, F., et al. Performance of an electronic nose for quality estimation of ground meat. *Meas. Sci. Technol.*, 1993, vol. 4, p. 1493–1500.
27. ZERINQUE, HJ. – BHATNAGAR, D. – CLEVELAND, TE. C15H24 volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, p. 2264–2270.

Korespondence: Ing. Kamil KUČA, Ph.D.
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Centrum pokročilých studií
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: kukacam@pmfhk.cz

Do redakce došlo 9. 11. 2007