

VYUŽITÍ KULTIVAČNÍCH A BIOCHEMICKÝCH METOD A POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE PRO STANOVENÍ *CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM*

R. Burdychová, P. Sládková

Došlo: 9. července 2007

Abstract

BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P.: *Detection of Clostridium tyrobutyricum using cultivation and biochemical methods and polymerase chain reaction*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2007, LV, No. 5, pp. 23–28

Anaerobic spore-forming bacteria of the genus *Clostridium* are commonly present in raw milk and some milk products. Their spores can survive pasteurization and can provoke so called late blowing defect in cheese caused by butyric acid fermentation. The only species of the genus *Clostridium* that is able to provoke late blowing is *Clostridium tyrobutyricum*.

In this work, two cultivation methods for detection of butyric acid producing clostridia in raw and pasteurized milk and in cheese samples were compared. The results show that tube method is suitable for route identification (in concentration 10^2 CFU/ml or /g) of clostridia in milk and cheese. The standard cultivation technique is suitable for more sensitive identification (10 CFU/ml or /g). All presumptive colonies grown anaerobically on selective RCM agar with polymyxine B (500 µg/ml) were classified to be of species *Clostridium tyrobutyricum* using PCR only. The confirmation using API tests were different in 50 % cases. The results show, that described PCR method is suitable for rapid screening of the presence of *Clostridium tyrobutyricum* in milk and cheese. PCR from one colony is possible to use for the analysis.

Clostridium tyrobutyricum, raw and pasteurized milk, cheese, species-specific PCR

Bakterie máselného kvašení rodu *Clostridium* se podílejí na znehodnocení některých mléčných výrobků, především mléka a sýrů. Do mléka se bakterie máselného kvašení dostávají s nečistotami (především z výkalů) a zkrmováním nevhodných krmiv (špatně prokysaná kvašená krmiva a siláže, zkažená nebo znečištěná průmyslová a přirozená krmiva). Pasterace mléka před vlastní výrobou sýrů neinaktivuje spory sporotvorných mikroorganismů, které lze zničit pouze teplotami vyššími než 120 °C. Při dlouhodobém zrání polotvrdých sýrů dochází k poklesu množství laktózy vlivem fermentační aktivity bakterií mléčného kvašení. Tvoří se kyselina mléčná a laktát vápenatý, zvyšuje se pH sýrů a tím vznikají vhodné podmínky pro vyklíčení spor sporotvorných mikro-

organismů. Vyklíčení spor může trvat řádově i týdny, podle podmínek prostředí uvnitř zrajících sýrů (pH, aktivita vody, redoxní potenciál, obsah NaCl). Metabolickou aktivitou sporotvorných organismů vzniká kyselina máselná, vodík a oxid uhličitý; dochází k tvorbě větších i menších dutinek oddělených od sebe tenkou blanou a sýry získávají pálivou chuť po zvětralém másle. Tato vada se označuje jako pozdní duření sýrů (BERGLE a SIVELA, 1990). Pozdní duření sýrů je připisováno druhu *Clostridium tyrobutyricum*. Bakterie druhu *C. tyrobutyricum* byly poprvé izolovány a popsány VAN BEYNUMEM a PETTEM v roce 1935 a byly pojmenovány podle řeckého slova „tyros“ (sýr).

Většina metod zabývajících se detekcí přítomnosti bakterií máselného kvašení v mléce a mléčných výrobcích je proto zaměřena na identifikaci a kvantifikaci druhu *C. tyrobutyricum*.

Identifikace bakteriálního rodu *Clostridium* kulti-vačními mikrobiologickými metodami není obtížná a vychází ze skutečnosti, že tento rod tvoří endospory, je obligátně anaerobní a Gram pozitivní. Pro stanovení klostridií se používá řada kultivačních médií. Hojně používaným je obohacené médium (reinforced clostridial medium, RCM), které je určeno pro stanovení celkového počtu sporotvorných klostridií v pasterovaných vzorcích potravin.

Stanovení druhů klostridií máselného kvašení v rámci rodu je klasickými mikrobiologickými metodami obtížné a kombinuje se s metodami biochemickými. Časté je použití API testů (Biomérieux, Francie), které se opírají o fenotypové vlastnosti mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že různé terénní kmeny *C. tyrobutyricum* mohou mít poněkud odlišné fenotypové vlastnosti než kmeny sbírkové, pro které jsou tyto testy obvykle definovány, bývá laboratorní diagnostika s aplikací těchto metod často nejednoznačná.

Z důvodu nepřesnosti v diagnostice druhu *C. tyrobutyricum* pomocí API testů a jejich poměrně vysoké finanční náročnosti byly vypracovány metody, vycházející z analýzy genomové DNA, které vynikají vysokou přesností a citlivostí (HERMAN a kol., 1995).

Cílem této práce bylo porovnat dvě kultivační metody pro detekci bakteriálního druhu *C. tyrobutyricum* v reálných vzorcích syrového a pasterovaného mléka a v polotvrdých sýrech. Dalším úkolem bylo konfirmovat přítomnost *C. tyrobutyricum* pomocí API testů a pomocí druhově specifické PCR a obě tyto metody porovnat.

MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny a jejich růstové podmínky

Bakteriální kmen *Clostridium tyrobutyricum* 112 byl získán od Ing. Drába (Výzkumný ústav mlékařenský MILCOM, a. s., pobočka Tábor). Buňky byly kultivovány na RCM agar s neutrální červení (MILCOM, a.s.) při 37 °C pět dní za anaerobních podmínek. Kmen byl použit jako pozitivní kontrola pro zkumavkovou, kultivační a biochemickou identifikaci a pro PCR.

Izolace mikroorganismů z mléka a sýrů

Vzorky mléka (nepasterované a pasterované) a sýrů (polotvrdé sýry s viditelnou vadou pozdního duření) byly odebrány dle ČSN ISO 707 pro odběr vzorků mléka a mléčných výrobků. Vzorky byly zpraco-

vány dle ČSN ISO 8261. Pro inaktivaci nesporulující mikroflóry byly vzorky zahřáty ve vodní lázni při 85 °C 15 min. 1 ml příslušného ředění byl pipetován na Petriho misky a zalit půdou RCM s neutrální červení (MILCOM, ČR) a polymyxinem B (500 mg/l roztoku). Misky byly kultivovány při 37 °C pět dní v anaerobních podmínkách.

Při zkumavkové metodě byl napipetován 1 ml příslušného ředění vzorku po inaktivaci do sterilní zkumavky a do zkumavky bylo přidáno 9 ml RCM média. Obsah zkumavky byl šetrně promíchán a po mírném zchladnutí zalit sterilním parafinovým voskem z důvodu zajištění anaerobního prostředí. Zkumavky byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu jednoho až pěti dní.

Izolace DNA a PCR

Lyze buněk sbírkové kultury, izolace DNA, její purifikace a způsob stanovení koncentrace a čistoty byly provedeny dle SAMBROOKA a kol. (2001) a AUSUBELA a kol. (1994). Pro amplifikaci specifické DNA sekvence *C. tyrobutyricum* byla použita „hnízdová“ PCR a dvě dvojice specifických oligonukleotidových primerů (Ct1F/Ct1R a Ct2F/Ct2R; HERMA a kol., 1995). Specifické primery byly navrženy pro amplifikaci 16S-23S rRNA mezeríku DNA *C. tyrobutyricum* (číslo v genové bance L08062; HERMAN a kol., 1995). PCR reakce byla provedena v termocykleru PTC 130 (MJ Research, Waltham, MA, USA) v celkovém objemu 25 µl a obsahovala 10 ng purifikované DNA v prvním PCR cyklu a 5 µl PCR produktu v druhém cyklu, 10 pmol každého primeru, 1U HotStar *Taq* DNA polymerázy a příslušné množství HotStar *Taq* Master Mixu (Qiagen, Hilden, Německo). Templátové DNA byly nejprve denaturovány inkubací při 95 °C 15 min. DNA byla amplifikována ve 30 cyklech (denaturace při 95 °C/45 s, hybridizace primerů při 55 °C/45 s a syntéza komplementárního DNA řetězce při 72 °C/75 s). V posledním amplifikačním cyklu byla teplota 72 °C prodloužena na 10 min. Jako pozitivní kontrola PCR byla použita DNA izolovaná z buněk kontrolního kmene *Clostridium tyrobutyricum* 112. Jako negativní kontrola PCR byly použity komponenty PCR bez DNA. Při identifikaci vykultivovaných kolonií z analyzovaných vzorků mléka a sýrů byla do PCR reakce jako DNA templát použita bakteriální kolonie narostlá na RCM agar s polymyxinem B. PCR produkty o velikosti 173 bp byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na přístroji Easy, model B1 (Owl Scientific, USA) a vizualizovány na UV transluminátoru (EB-20E Ultralum, USA) po nabarvení ethidium bromidem (0,5 µg/ml).

VÝSLEDKY

Odebráno bylo celkem deset vzorků směsného syrového mléka (č. 1–10, viz Tab. I) od různých producentů, deset vzorků téhož mléka po pasteraci (č. 11–20, viz Tab. I) a dva vzorky polotvrdých sýrů s viditelnou vadou pozdního duření (č. 21 a 22, viz Tab. I). Zkumavková metoda byla v této práci využita k orientačnímu stanovení přítomnosti anaerobních klostridií. Tato metoda je nejnověji doporučena k rychlému stanovení druhů *Clostridium* sp. produkujících kyseliny a plyn v mléku (NĚMEČKOVÁ a kol., 2006).

Již po 24 hodinách kultivace byly zaznamenány pozitivní reakce, konečné výsledky byly odečteny po 48 hodinách. Vlivem tvořící se kyseliny máselné, octové a mléčné docházelo ke změně barvy média z červeno-fialové na žlutohnědou. Tvorbou vodíku a oxidu uhličitého byla parafinová zátka vyražena směrem vzhůru a agar ve zkumavce byl na několika místech potrhán. Pozitivní reakci poskytly dva vzorky nepasterovaného mléka (č. 1 a 6, Tab. I), jeden vzorek pasterovaného mléka (č. 11, Tab. I) a oba vzorky sýra (č. 21 a 22, Tab. I). Tři vzorky poskytly falešně negativní reakci (č. 5, 15 a 16, Tab. I).

I: Srovnání výsledků stanovení anaerobních klostridií a druhu *C. tyrobutyricum* zkumavkovou metodou, kultivační metodou na pevném agaru, biochemickou identifikací a identifikací pomocí PCR

Vzorek	Číslo vzorku	Kultivační metody		Konfirmace	
		kultivace ve zkumavkách (48 hod kultivace)	kultivace na plotnách (KTJ/ml mléka, KTJ/g sýra), 5 dní kultivace	API test	PCR
nepasterované mléko	1	+	$(2,40 \pm 0,02) \times 10^2$	<i>C. butyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
	2	–	–	–	–
	3	–	–	–	–
	4	–	–	–	–
	5	– ^{a)}	$(5,20 \pm 0,07) \times 10^1$	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
	6	+	$(6,40 \pm 0,07) \times 10^1$	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
	7	–	–	–	–
	8	–	–	–	–
	9	–	–	–	–
	10	–	–	–	–
pasterované mléko	11	+	$(5,80 \pm 0,11) \times 10^1$	<i>C. butyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
	12	–	–	–	–
	13	–	–	–	–
	14	–	–	–	–
	15	– ^{a)}	$(1,80 \pm 0,11) \times 10^1$	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
	16	– ^{a)}	$(2,20 \pm 0,11) \times 10^1$	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
	17	–	–	–	–
	18	–	–	–	–
	19	–	–	–	–
	20	–	–	–	–
sýry	21	+	$(1,00 \pm 0,11) \times 10^2$	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
	22	+	$(5,50 \pm 0,23) \times 10^2$	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>

+ růst bakteriální kultury a bakteriálních kolonií pozitivní

– růst bakteriální kultury a bakteriálních kolonií negativní

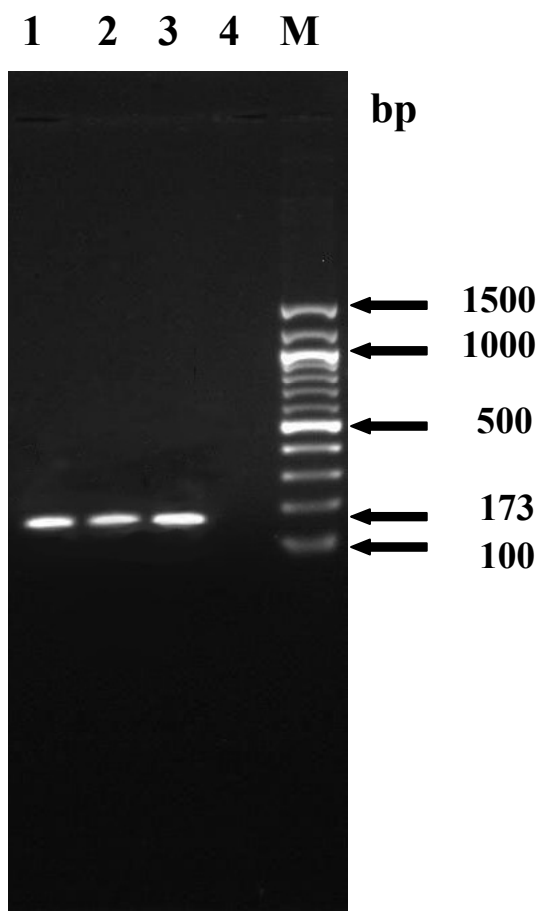
^{a)} falešně negativní výsledek

Stanovení počtů *C. tyrobutyricum* ve vzorcích mléka a sýrů bylo provedeno plotnovou kultivační metodou. Klostridia byly detekovány ve třech vzorcích nepasterovaného mléka (č. 1, 5, 6, Tab. I) a třech vzorcích pasterovaného mléka (č. 11, 15, 16, Tab. I) a v obou vzorcích sýra (č. 21 a 22, Tab. I) růstem specifických, velkých čoučkovitých žlutých kolonií. Čichem bylo možné zaznamenat zápach po kyselině máselné, což ukazovalo na růst *C. tyrobutyricum*. Tvorba vodíku byla patrná potrháním agarů. Tab. I uvádí počty mikroorganismů KTJ/ml mléka nebo KTJ/g sýra v jednotlivých vzorcích, výsledky jsou statisticky zpracovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Uvedené výsledky potvrzují, že je zkumavková metoda vhodná k rychlému orientačnímu stanovení klostridií v mléku (v koncentraci 10^2 /ml), k citlivějšímu průkazu (10^1 /ml) přítomnosti klostridií v analyzovaném vzorku je vhodnější časově náročnější kultivační metoda.

Zařazení do druhu *C. tyrobutyricum* byl prováděno pomocí API testu API 50 CHB (BioMérieux, Francie) a pomocí druhově specifické PCR. Při identifikaci pomocí biochemických API testů byl identifikován druh *C. tyrobutyricum* ve 4 vzorcích (Tab. I, vzorek č. 5, 15, 21 a 22), zatímco ve 4 vzorcích byl identifikován jiný druh (*C. butyricum*, *C. sporogenes*; Tab. I, vzorek č. 1, 6, 11 a 16). Použitím druhově specifické PCR z 1 bakteriální kolonie byl bakteriální druh *C. tyrobutyricum* jednoznačně identifikován ve všech vzorcích. Detekce specifických PCR produktů o délce 173 bp získaných amplifikací z DNA bakteriálních kolonií narostlých ze vzorků nepasterovaného a pasterovaného mléka je uvedena na Obr. 1.

DISKUSE

Před vlastní výrobou sýrů je vhodné vzhledem k jejich kvalitě stanovit počet sporotvorných mikroorganismů *C. tyrobutyricum* v mléce, protože tyto bakterie jsou ve formě spor schopny přežít pasteurizační teplotu a způsobovat vadu pozdního duření při zrání sýrů. Množství spor, které pozdní duření způsobuje, se pohybuje v širokém rozmezí; bylo popsáno, že minimální množství je již pět spor na litr mléka (HERMAN a kol., 1995). Počet spor, které způsobuje pozdní duření sýrů, je závislé také na velikosti a tvaru sýra. Jsou známy i případy, kdy kontaminace jednou endosporou *C. tyrobutyricum* způsobila vadu pozdního duření u sýru Gouda (CHENG a INGHAM, 1999). HERMAN a kol. (1995) optimalizovali metodu stanovení počtu spor *C. tyrobutyricum* v mléku určeném pro výrobu polotvrdých sýrů. Tato metoda je velmi rychlá, výsledky stanovení mohou být známy do 24 hod a autoři ji doporučují pro skrining mléka před vlastní výrobou sýrů.



1: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (173 bp) amplifikovaných z bakteriálních kolonií narostlých ze vzorků nepasterovaného a pasterovaného mléka.

Běh č. 1 a 2: kolonie narostlá ze vzorku nepasterovaného (Tab. I, vzorek č. 1) a pasterovaného mléka (Tab. I, vzorek č. 11), běh č. 3: pozitivní PCR kontrola (*C. tyrobutyricum* 112, 10 ng DNA), běh č. 4: negativní PCR kontrola, M: 100 bp ladder (New England Biolabs, Anglie)

KLIJN a kol. (1995) ve své studii uvádějí, že i přes poměrně vysoký počet spor *C. tyrobutyricum* v mléku nedocházelo u vyrobeného sýra k vadě pozdního duření. Spory zřejmě měly sníženou schopnost germinace. Bylo také popsáno, že spory různých terénních kmenů *C. tyrobutyricum* nemusí vynikat schopností tvořit ve významných koncentracích kyselinu máselnou a vodík (KLIJN a kol., 1995).

Zvážením uvedených skutečností byly v této práci použity kultivační metody detekce vegetativního stadia *C. tyrobutyricum* v mléku a v sýrech. Stanovením počtu vegetativních buněk *C. tyrobutyricum* se zabývaly i jiné práce (STADHOUDERS a kol., 1985; NIEUWENHOF a kol., 1994). Pro konfirmaci přítomnosti *C. tyrobutyricum* autoři používali bioche-

mické testy. Z literatury je známo, že jsou výsledky testů, které vycházejí z fenotypových vlastností bakterií často nejednoznačné a vedou k mylným interpretacím, protože se vlastnosti terénních kmenů mohou značně lišit od vlastností kmenů sbírkových, pomocí nichž jsou biochemické testy definovány (FACKLAM a COLLINS, 1989). *C. tyrobutyricum* je navíc poměrně náročné odlišit běžnými kultivačními a biochemickými metodami od jiných druhů rodu *Clostridium*, které se v mléku a sýrech také často objevují, ale vadu pozdního duření sýrů nezpůsobují. MOCQUOT (1979) nebo GUERICKE (1993) předpokládali, že se na nežádoucím pozdním duření sýrů podílejí i druhy *C. beijerinckii*, *C. butyricum* a *C. sporogenes*. Tento předpoklad byl vyvrácen zavedením molekulárně-biologických detekčních metod v laboratorní diagnostice mikroorganismů. V práci KLIJNA a kol. (1995), ve které byly analyzovány sýry s vadou pozdního duření, byla detekována pouze DNA *Clostridium tyrobutyricum*.

Pro PCR detekci buněk přímo v analyzovaném vzorku je nutné vycházet z předpokladu, že v 1 (5) µl vzorku pro PCR musí být alespoň 1 cílová bakterie (tj. 10^3 /ml). Vzhledem k tomu, že pro vznik vady pozdního duření stačí mnohem menší množství buněk,

byl volen postup využívající nejprve kultivace a poté PCR identifikace. S využitím zkumavkové metody a PCR bylo možno velmi rychle (do 48 hod) analyzovat ty vzorky, které obsahovaly větší množství cílových buněk (10^2 /ml).

V této práci prokazujeme, že druh *C. tyrobutyricum* byl pomocí PCR detekován ve všech pozitivních vzorcích nepasterovaného a pasterovaného mléka, stejně jako ve vzorcích sýrů, i když byly výsledky průkazu tohoto druhu použitím biochemických testů v 50 % případů odlišné (Tab. I).

Využití druhově specifické PCR při detekci bakterií *C. tyrobutyricum* významně usnadňuje jejich správnou identifikaci. Popsaná metoda využívá kultivace klostridií na diferenciacním médiu a následnou PCR, která umožňuje poměrně rychle identifikovat přítomnost *C. tyrobutyricum* v mléku a sýrech. Umožní tak snížit možnost vzniku vady pozdního duření sýrů, případně vzniku vad šelestu či nadouvání tavených sýrů. I když je doba potřebná pro správnou identifikaci *C. tyrobutyricum* vzhledem k době potřebné pro zpracování mléka na sýry poměrně dlouhá (2–5 dní), po odhalení jeho nežádoucí přítomnosti lze sýry vyrobené z kontaminovaného mléka vyřadit a nečekat tak na projev nežádoucí vady pozdního duření.

SOUHRN

V syrovém mléku mohou být přítomny anaerobní sporotvorné bakterie rodu *Clostridium*. Spory těchto mikroorganismů mohou přežívat pasteraci a být příčinou tzv. pozdního duření sýrů. Za původce této vady sýrů byl v nejnovějších studiích označen jediný bakteriální druh, *Clostridium tyrobutyricum*.

V této práci byly srovnány dvě kultivační metody detekce klostridií máselného kvašení v reálných vzorcích syrového a pasterovaného mléka a v polotvrdých sýrech. Výsledky ukázaly, že je zkumavková metoda vhodná k rychlému orientačnímu stanovení klostridií v mléku a sýrech (v koncentraci 10^2 KTJ/ml nebo /g), k citlivějšímu průkazu (10^1 KTJ/ml nebo /g) přítomnosti klostridií v analyzovaném vzorku je vhodnější časově náročnější kultivační metoda.

Pomocí druhově specifické PCR byly všechny presumptivní kolonie narostlé anaerobně na selektivním RCM agar s polymyxinem B (500 µg/ml) identifikovány jako druh *C. tyrobutyricum*. Konfirmace pomocí API testů byla v 50 % případů odlišná. Výsledky prokázaly, že je PCR metoda vhodná pro rychlý průkaz přítomnosti *C. tyrobutyricum* v mléku a sýrech. Lze využít i PCR z jedné bakteriální kolonie.

Clostridium tyrobutyricum, syrové a pasterované mléko, sýr, druhově specifická PCR

LITERATURA

- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K.: Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1994, 350 p. ISBN 0-47150-338-X.
- BERGLE, J. L. a SIVELA, S.: Detection and enumeration of clostridial spores related to cheese quality I classical and new methods. *Bulletin of the IDF*. 1990, 251: 17–23.
- FACKLAM, R. R., COLLINS, M. D.: Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27: 3340–3343.

- GUERICKE, S.: Laktatvergarende Clostridien bei der Kaseherstellung. *Deutsche Milchwirtschaft*. 1993, 44: 735–739.
- HERMAN, L. M. F., DE BLOCK, J. H., WAES, G. M.: A direct PCR Detection Method for *Clostridium tyrobutyricum* Spores in up to 100 Milliliters of Raw Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 12: 4141–4146.
- CHENG, S. Y., INGHAM, S. C.: Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. in Gouda Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 54, 3: 15–24.
- KLIJN, N., NIEUWENHOF, F. F. J., HOOLWERF, J. D., VAN DER WAALS, C. B., WEERKAMP, P. A. H.: Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the Causative Agent of Late Blowing in Cheese by Species-Specific PCR Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61: 2919–2924.
- MOCQUOT, G.: Reviews of the progress of Dairy Science: Swiss-type cheese. *J. Dairy Res.* 1979, 46: 133–160.
- NĚMEČKOVÁ, I., PECHAČOVÁ, M., ROUBAL, P.: Semikvantitativní stanovení *Clostridium* sp. zkumavkovou metodou. *Mlékařské listy*. 2006, 95: 16–17.
- NIEUWENHOF, F. N., KLIJN, N., WEERKAMP, A. H.: Detectie en identificatie van clostridia in kaas met heulp van DNA-probes. *Voedingsmiddelen-technologie*. 1994: 16/17: 11–15.
- SAMBROOK, J., MACCALLUM, P., RUSSELL, D.: Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001, 2344 pp. ISBN 0-87969-577-3.
- STADHOUDERS J., HUP, G., NIEWENHOF, F. F. J.: Silage and cheese quality. *NIZO Mededeling*. 1985, M19A: 1–40.
- VAN BEYNUM, J., PETTE, J. W.: Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1935. Abteilung II. 93: 198–212.

Adresa

Ing. Radka Burdychová, Ph.D., Ing. Pavla Sládková, Ústav technologie potravin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika