



GRAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260445  
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 15 12 86  
(21) (PV 9302-86.L)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 Q 1/14  
C 12 R 1/46

(40) Zveřejněno 15 03 88

(45) Vydáno 15 04 89

(75)

Autor vynálezu

ERBAN VLADIMÍR RNDr. CSc., JIČÍNSKÁ EVA RNDr. CSc.,  
CVAK ZDENĚK RNDr. CSc., SALABA FRANTIŠEK Ing., PRAHA

(54) Způsob rozlišení *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* a jiných bakteriálních druhů metabolizujících cukry za tvorby kyselin

1

2

Navržený způsob diferenciacce umožňuje rozlišit příbuzné kmeny, které mají schopnost tvořit kyseliny na růstovém agaru, a které se liší ve schopnosti využívat některou aminokyselinu z agarového růstového média za současného uvolnění amonných iontů do prostředí. Kolonie se liší na růstovém agaru, který obsahuje vhodnou pH indikátorovou barvu (bromkresolpurpur) a bentonit. Kolonie *Streptococcus cremoris* se schopností tvořit kyseliny jsou žluté až oranžové a mají žlutou zónu kolem. Kolonie *Streptococcus lactis*, které mají navíc schopnost využívat některou aminokyselinu a uvolňovat amonné ionty do prostředí, se stávají po 2 až 3 dnech opět bílé až modré s modrou zónou.

Vynález se týká způsobu rozlišení bakteriálních druhů *Streptococcus lactis* vedle *Streptococcus cremoris* a všech příbuzných bakteriálních druhů schopných metabolizovat cukry za tvorby kyselin, které se liší ve schopnosti využívat některou aminokyselinu na agarových půdách obsahujících bentonit.

Dosavadní způsob rozlišení *Streptococcus lactis* a *Streptococcus cremoris* byl možný pouze ve velmi omezené míře, neboť toto rozlišení mohli provádět pouze pracovníci s velkými zkušenostmi podle mikroskopického obrazu, ve kterém se jednotlivé druhy nepatrně liší. Rozlišení lze provést také podle velikosti kolonií na agarových plotnách, která jsou však velmi nepřesná, neboť mezi jednotlivými kmeny jednotlivých druhů je velká variabilita ve velikosti kolonií a mezi kmeny jednotlivých druhů dochází ke značnému překryvu statistických křivek velikosti kolonií. Ve světě byla sice popsána metoda na rozlišení *Streptococcus lactis* a *Streptococcus cremoris*, ale vzhledem k velmi pracné přípravě média, které obsahuje karboxymethylcelulózu, nedoznala rozšíření.

Podstata řešení spočívá jednak v obecné vlastnosti všech streptokoků mléčného kvašení tvořit kyselinu mléčnou, která je vylučována do prostředí s pH indikátorovým barvivem bromkresolpurpurem, který přechází z modré barvy na žlutou, a jednak ve schopnosti charakteristické pouze pro *Streptococcus lactis* využít arginin, jako zdroj uhlíku a uvolňovat do prostředí amonné ionty, které prostředí alkalizují, a tím se žlutá barva kolem kolonií mění opět na modrou. Rozplývání uvolněných metabolitů do širokého okolí zabraňuje právě bentonit, svými iontoměnnými vlastnostmi. Kromě toho je bentonit do norem mikroelementů a sobě toxických zplodin umožňuje růst kolonií v kompaktnější formě, která se projevuje lepší rozlišitelností na pozadí a celkově menším průměrem kolonií. Tato vlastnost je výhodná zejména při hustších nárůstech na agarových plotnách, kdy nedochází k výraznému vzájemnému ovlivnění kolonií.

#### Příklad

Základní médium obsahuje:

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob rozlišení *Streptococcus lactis* vedle *Streptococcus cremoris* a jiných bakteriálních druhů metabolizujících cukry za tvorby kyselin, vyznačující se tím, že strep-

5 g tryptonu; 5 g kvasničného extraktu; 2,5 g enzymatického hydrolyzátu kaseinu; 5 g argininu HCl; 1,25 g  $K_2HPO_4$ ; 10 g citranu vápenatého; 15 g bentonitu a 15 g agaru. Po rozpuštění se upraví pH na hodnotách 5,6-6-N HCl a vysterilizuje se při 121 °C po dobu 15 min. Těsně před nalitím na Petriho misky se přidá 5 ml 10% sterilního obnoveného odstředěného mléka, 10 ml sterilního  $CaCO_3$  v destilované vodě a 2 ml sterilního 0,1% vodného roztoku bromkresolpurpuru na každých 100 ml základního agarového média rozpuštěného a vytemperovaného na teplotu 55 °C. Opatrně promíchané médium se nalévá na Petriho misky v tloušťce 3 až 4 mm agaru.

Inokulace:

Rozetřením 0,1 ml odpovídajícího ředění na povrch agarové plotny.

Inkubace:

Misky s naočkovanou kulturou se inkubují při 30 °C 2 až 3 dny.

Odečet kolonií:

Po 64 hodinách inkubace:

Kmen *Streptococcus cremoris* N4: na pís-kově zbarvené půdě jsou žluté kolonie až oranžové kolonie s výraznou žlutou zónou kolem. Průměrná velikost kolonií je 1,22 mm se standardní odchylkou 0,2 mm.

Kmen *Streptococcus lactis* 358: na žluto-fialové půdě jsou velké bílé kolonie s modrou zónou kolem. Průměrná velikost kolonií je 3,23 mm se standardní odchylkou 0,91 mm.

Výhody vynálezu spočívají zejména ve zpřesnění diagnostické metodiky pro bakterie mléčného kvašení. Pro svou poměrnou jednoduchost a dostupnost domácích surovin bude mít významné uplatnění v průmyslové mikrobiologii, v mlékárenství a jiných odvětvích potravinářského průmyslu.

tokokové bakterie se zaočkují na agar s pří-davkem bentonitu v množství 5 až 20 g/l, přičemž po inkubaci se odliší *Streptococcus lactis* bílým až modrým zbarvením kolonií.