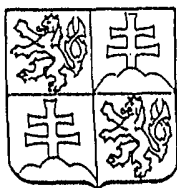


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

270 107

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. ⁴
C 12 Q 1/04

(21) PV 9577-86.Y

(22) Prihlásené 19 12 86

(40) Zverejnené 13 10 89

(45) Vydané 27 02 '91

(75)

Autor vynálezu

KMEŤ VLADIMÍR MVDr. CSc., KOŠICE,
KOPEČNÝ JAN ing. CSc., ŘÍČANY,
LEŠKO ZOLTÁN ing., VRANOV NAD TOPĚLOU

(54)

Spôsob určovania celulolytickej aktivity
bachorových baktérií

(57) Podstatou riešenia je pridanie riedkeho celulóзовého gélu s naviazaným grafitom alebo živočišným uhlím do anaeróbneho bujónu, obsahujúceho celobiózu v množstve 0,01 až 0,05 dielov hmotnostných, bachorovú tekutinu v množstve 5 až 30 dielov hmotnostných a minerálie v množstve 1 až 15 dielov hmotnostných a 24 až 48 hodinová inkubácia testovaného kmeňa pri 35 °C až 45 °C, pričom celulolytická aktivita sa prejaví uvoľnením grafitu alebo živočišného uhlia do média.

Vynález sa týka nového spôsobu určovania celulolytickej aktivity bachorových baktérií.

V súčasnosti používaný klasický spôsob určovania celulolytickej aktivity bachorových baktérií, podstatou ktorého je odčítavanie zón utilizovanej amorfnej celulózy je pomerne náročný na čas a je pracný. Okrem toho vyžaduje veľké mikrobiologické skúsenosti pri odčítavaní reakcií. Veľký pokrok znamenajú systémy, v ktorých na amorfnú celulózu je naviazané farbivo, napríklad Biely a kol. 1985, Anal. Biochem. 144, 142-146 bolo vyvinuté nové médium pre detekciu celulózovej aktivity podstatou ktorého je na hydroxyetylcelulózu naviazané farbivo trojsodná soľ 2-chlór-4-N-etyl-N-fenylamino)-6-7/4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino/-1, 3, 5-triazin (Ostazin Brilliant Red). Toto veľmi progresívne médium má však pri diagnostike celulolytických bachorových baktérií nevýhodu v tom, že jeho farebnosť sa kryje s indikátorom redox potenciálu rezazurinom. Pri jeho používaní nie je možná kontrola redox potenciálu pripravenej živnej pôdy. Podobnú nevýhodu vo farebnosti majú aj priesvitné gély z hydroxyetylcelulózy, podstatou ktorých je ich rozpúšťanie sa psoobením celulóz. Gély sú však pri diagnostike celulolytickej aktivity bachorových baktérií v tmavo sfarbenej pôde ťažšie viditeľné. Slabo pozitívna reakcia sa nedá odčítať bez otvorenia skúmavky. Kvantitatívne, celulolytickú aktivitu bachorových baktérií je možné stanoviť metódou redukujúcich cukrov uvoľňovaných z rozpustnej celulózy, napríklad pomocou kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej. Táto metóda je však pri veľkom počte kmeňov bachorových baktérií pomerne práčna.

Vyššie uvedené nedostatky sú odstránené spôsobom určovania celulolytickej aktivity bachorových baktérií podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že riedky gél z rozpustnej celulózy s naviazaným grafitom alebo živočišným uhlím sa pridá do anaeróbného bujónu obsahujúceho celobiózu v množstve 0,01 až 0,05 dielov hmotnostných, bachorovú tekutinu v množstve 5 až 30 dielov hmotnostných a minerálne najmä hydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný, síran amónny, dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid vápenatý, síran horečnatý v množstve 1 až 15 dielov hmotnostných, naočkuje sa testovaný kmeň a po 24 až 48 hodinovej inkubácii pri teplote 35 °C až 45 °C pozitívnu celulolytickú aktivitu indikuje do média uvoľnený grafit alebo živočišné uhlie.

Hlavnou výhodou tohoto nového spôsobu je jednoznačné určovanie pozitívnej alebo negatívnej reakcie pri diagnostike celulolytických bachorových baktérií pri zachovaní podmienky kontroly redox potenciálu živnej pôdy. Ďalšími výhodami sú malá pracnosť ako aj malá náročnosť na laboratórne vybavenie.

Príklad 1

Rozpusťná celulóza sa rozpustí v minimálnom množstve vody a k 10 ml tohto roztoku sa pridá 5 ml 5 N hydroxidu sodného. Po vytemperovaní na 50 °C sa pridá 500 mg grafitu a za stáleho pretrepávania sa pridá 5 ml epichlórhydrínu. Po vychladnutí sa gél premyje a rozstrihá na malé kúsky a nadávkuje do penicilínok s modifikovaným anaeróbnym bujónom obsahujúcim 0,05 dielov hmot. celobiózy, ďalej 20 dielov hmot. bachorovej tekutiny a 15 dielov hmot. minerálií. Po naočkovaní testovaného celulolytického kmeňa *Bacteroides succinogenes* a nasledovnej 36 hodinovej inkubácii pri 37 °C pozitívnu reakciu indikuje do média uvoľnený grafit.

Príklad 2

Premytý a rozstrihaný gél pripravený ako v príklade 1, sa pridá do penicilínok s modifikovaným anaeróbnym bujónom obsahujúcim 0,01 dielov hmot. celobiózy, 10 dielov hmot. bachorovej tekutiny a 7,5 dielov hmot. minerálií. Po naočkovaní kmeňa *Ruminococcus albus* a nasledovnej 48 hodinovej inkubácii pri 37 °C, celulolytickú aktivitu indikoval do média uvoľnený grafit.

Do bujónu použitá zmes minerálií má napr. zloženie:

hydrogenfosforečnan draselný K_2HPO_4	0,6	dielov hmot.
chlorid sodný NaCl	1,2	dielov hmot.
síran amónny $NH_4/2SO_4$	1,2	dielov hmot.
dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4	0,6	dielov hmot.
chlorid vápenatý $CaCl_2$	0,12	dielov hmot.
síran horečnatý heptahydrát	0,25	dielov hmot.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob určovania celulolytickej aktivity bachorových baktérií, vyznačujúci sa tým, že sa riedky gél z rozpustnej celulózy s naviazaným grafitom alebo živočíšnym uhlím pridá do anaeróbneho bujónu obsahujúceho celobiózu v množstve 0,01 až 0,05 dielov hmotnostných, bachorovú tekutinu v množstve 5 až 30 dielov hmotnostných a minerálie, najmä hydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný, síran amónny, dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid vápenatý, síran horečnatý, v množstve 1 až 15 dielov hmotnostných, testovaný kmeň sa naočkuje a po 24 až 48 hodinovej inkubácii, pri teplote 35 °C až 45 °C, pozitívnu celulolytickú aktivitu indikuje do média uvoľnený grafit alebo živočíšne uhlie.