



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

227561

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 31/08

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 04 06 82
(21) PV 4172-82

(40) Zveřejněno 26 08 83
(45) Vydáno 01 06 86

(75)

Autor vynálezu

HÄUSLER JIŘÍ RNDr. CSc.,
RICHTER VLADIMÍR RNDr., PRAHA

(54) Způsob identifikace mikroorganismů pomocí chromatografie

Vynález se týká způsobu identifikace mikroorganismů pomocí chromatografie.

Dosud obvyklý způsob identifikace mikroorganismů je založen na sledování jejich morfologických, kultivačních, fyziologických a biochemických, po případě serologických a jiných vlastností. V případě bakterií a jim podobných mikroorganismů, které jsou morfologicky těžko rozeznatelné se při jejich identifikaci klade hlavní důraz na stanovení jejich fyziologických a biochemických vlastností na čisté kultuře organismu. Tento proces je zdoluhavý, obvykle trvá déle, než jeden týden a personálně i pracovně je náročný. K přesnému určení podle současných světových zvyklostí je potom zapotřebí provádět až 70 testů na různých kultivačních médiích.

Tyto nevýhody vyvolaly snahu využít k řešení dané problematiky moderních analytických přístrojů. Byly činěny pokusy o rozlišení dvou nebo několika kmenů jedné skupiny mikroorganismů, případně o hrubé rozlišení vzájemně nepříbuzných skupin mikroorganismů. Systematické zpracování celé čeledě, její odlišení od jiných podobných čeledí, vzájemné rozlišení jednotlivých rodů, druhů a zároveň i nižších taxonů uvnitř této čeledě však nebylo dosud provedeno. Stanovení mikroorganismů pomocí pyrolysy je velmi náročné z hlediska reprodukovatelnosti a interpretace získaných

výsledků. Z dosavadních známých způsobů identifikace se způsobu identifikace podle vynálezu blíží způsob podle amerického patentu č. 3,891,508 (J. Merrick), podle kterého se stanovením blíže nespecifikovaných sacharidů, obsažených v lipopolysacharidech buněčných stěn mikroorganismů od sebe rozlišují některé skupiny gram negativních bakterií. Způsobem uvedeným v popisu amerického patentu lze stanovit tyto skupiny mikroorganismů:

1. Střevní enterobakterie
2. Pseudomonas
3. Vibrio
4. Hemophilus
5. Bordetella
6. Pasteurella
7. Brucella
8. Neisseria

Pro každou z uvedených skupin však autor v popisu požaduje použít jiné kultivační médium což v praxi znamená, že je nutné v daném vzorku předem hrubě klasifikovat, o jakou z výše uvedených skupin se jedná. Podle tohoto postupu by také bylo obtížné stanovit více mikroorganismů vedle sebe a provést jejich podrobnou klasifikaci až na jednotlivé druhy, popřípadě serotypy.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se čistá

kultura mikroorganismu kultivuje za konstantních podmínek až do dosažení stacionární fáze růstu, získaná biomasa se oddělí centrifugací, promyje, vysuší a získaný vzorek se hydrolyzuje např. v kyselém prostředí chlorovodíkem, popřípadě esterifikuje např. methylátem sodným a po extrakci se chromatograficky stanoví vzniklé organické kyseliny nebo jejich estery a získané výsledky stanovení se porovnají s výsledky získanými u standardních kmenů mikroorganismů.

Tento postup využívá jevu, že jak pro každou taxonomickou skupinu mikroorganismů, tak i pro nižší taxony, jako je druh, popřípadě serotyp, je charakteristický určitý výskyt a vzájemný poměr organických kyselin, obsažených přímo v buňce mikroorganismu. Jedná se hlavně o hydroxykyseliny, kyseliny s cyklopropanovým kruhem, nasycené mastné kyseliny a nenasycené mastné kyseliny. Stanovení lze rozšířit i na další typy organických kyselin, např. ketokyseliny, kyseliny s více karboxylovými a hydroxylovými skupinami a aminokyseliny. Získané výsledky chromatografického stanovení tvoří charakteristický obraz, anglicky fingerprint, který je typický pro určitý mikroorganismus, při čemž vzhledem k reprodukovatelnosti výsledků, získaných za konstantních podmínek není rozhodující přesná znalost chemického složení a prostorového uspořádání jednotlivých organických kyselin, nebo jejich esterů, ale určení vzájemné podobnosti výsledků z jednotlivých chromatografických stanovení. Toto určení lze s výhodou provádět pomocí počítače s tím, že výsledky stanovení u standardních organismů jsou předem uloženy v databázi.

Tento způsob identifikace mikroorganismů dovoluje určit bez předběžné klasifikace na jednom typu půdy a současně vedle sebe nejen většinu gram negativních mikroorganismů, ale i většinu gram pozitivních organotrofních mikroorganismů, navíc při zkrácení potřebného času.

Charakteristické obrazce příslušné jednotlivým typům mikroorganismů jsou zřetelně rozlišitelné a pro některé je typický výskyt určitých organických kyselin. Např. pro čeleď *Pseudomonadaceae* je typická dominance kyselin se stejným elučním časem jaký má kyselina olejová, pro čeleď *Enterobacteriaceae* je typická dominance kyselin se stejným elučním časem jaký má kyselina palmitová.

Na přiložených výkresech jsou uvedeny normované grafické záznamy počítače. Na ose x je vynášen relativní eluční čas, na ose y je relativní výška píku. Na obrázku č. 1 je záznam charakteristický pro *Pseudomonas aeruginosa*, na obrázku č. 2 je záznam charakteristický pro *Vibrio cholerae*, na obrázku č. 3 je záznam charakteristický pro *Edwardsiella tarda* a na obrázku č. 4 je záznam charakteristický pro *Bacillus thuringiensis kurstakii*.

Na obr. 1 je záznam, charakteristický pro *Pseudomonas aeruginosa*. Pík 1 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaký má kyselina palmitolejová. Pík 2 odpovídá kyselinám se stejným

elučním časem jaký má kyselina palmitová. Pík 3 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaký má kyselina olejová.

Na obr. 2 je záznam, charakteristický pro *Vibrio cholerae*. Pík 4 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina myristová, pík 1 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem jaké má kyselina palmitolejová, pík 2 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina palmitová, pík 3 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina olejová.

Na obr. 3 je záznam typický pro *Edwardsiella tarda*. Pík 4 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina myristová, pík 2 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem jaké má kyselina palmitová, pík 5 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina methylenhexadekanová.

Na obr. 4 je záznam typický pro *Bacillus thuringiensis kurstakii*. Pík 4 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina isomyristová, pík 6 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina methyltetradekanová, pík 2 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina palmitová, pík 7 odpovídá kyselinám se stejným elučním časem, jaké má kyselina methylhexadekanová.

Konkrétní provedení identifikace mikroorganismů je pro všechny druhy stejné. Neznámá čistá kultura, např. vyrostlá při běžném stanovení indikátorů fekálního znečištění, se přeočkuje na povrch živného média o složení:

Masový výtažek (sušina) 10 g/l, pepton pro bakteriologii 10 g/l, chlorid sodný 5 g/l, agar 15 g/l, na petriho misku o průměru 10 cm tak, aby došlo k masovému nárostu a získalo se dostatečné množství biomasy. Po kultivační době, odpovídající dosazení stacionární fáze růstu sledovaného mikroorganismu, např. 24 hod., se biomasa smyje s povrchu agaru pomocí 5 ml izotonického roztoku NaCl do centrifugační kyvety o objemu 10 ml. Po centrifugaci se čistý supernatant slije, suspenze buněk se promyje 5 ml izotonického roztoku NaCl a znovu podrobí centrifugaci. Proces promývání se třikrát opakuje. Potom se zahuštěná suspenze buněk vysuší lyofilizací. Provede se esterifikace 20 mg suchého preparátu methylátem sodným. Vzniklé estery se extrahují do hexanu a po zahuštění odpařením hexanu na celkové množství 10 ml se provede nástřik 1 µl do injektoru plynového chromatografu s kolonou o délce 3 m a průměru 1,5 mm s nepolární fází.

Průtok nosného plynu dusíku je nastaven na 19 ml za minutu, detektor je použit plamenioionizační. Počáteční teplota je 100 °C, gradient 1 °C za minutu, konečná teplota je 260 °C. Získané výsledky lze pomocí integrátoru a počítače provést na normované diagramy, nebo pomocí počítače přímo zpracovat. Čas nutný k provedení celého postupu identifikace je cca 32 hodiny, z čehož samotná kultivace trvá 24 hodiny.

Tímto způsobem identifikace mikroorganismů lze výhodně určit mikroorganismy, zúčastňující se koloběhu biogenních prvků ve vodách při procesech samočištění, nebo při procesech biologického čištění odpadních vod, dále mikroorganismy, které mají klinický nebo hygienický význam a mikroor-

ganismy důležité pro potravinářský průmysl. Navržený způsob je vhodný i pro další odvětví technické mikrobiologie.

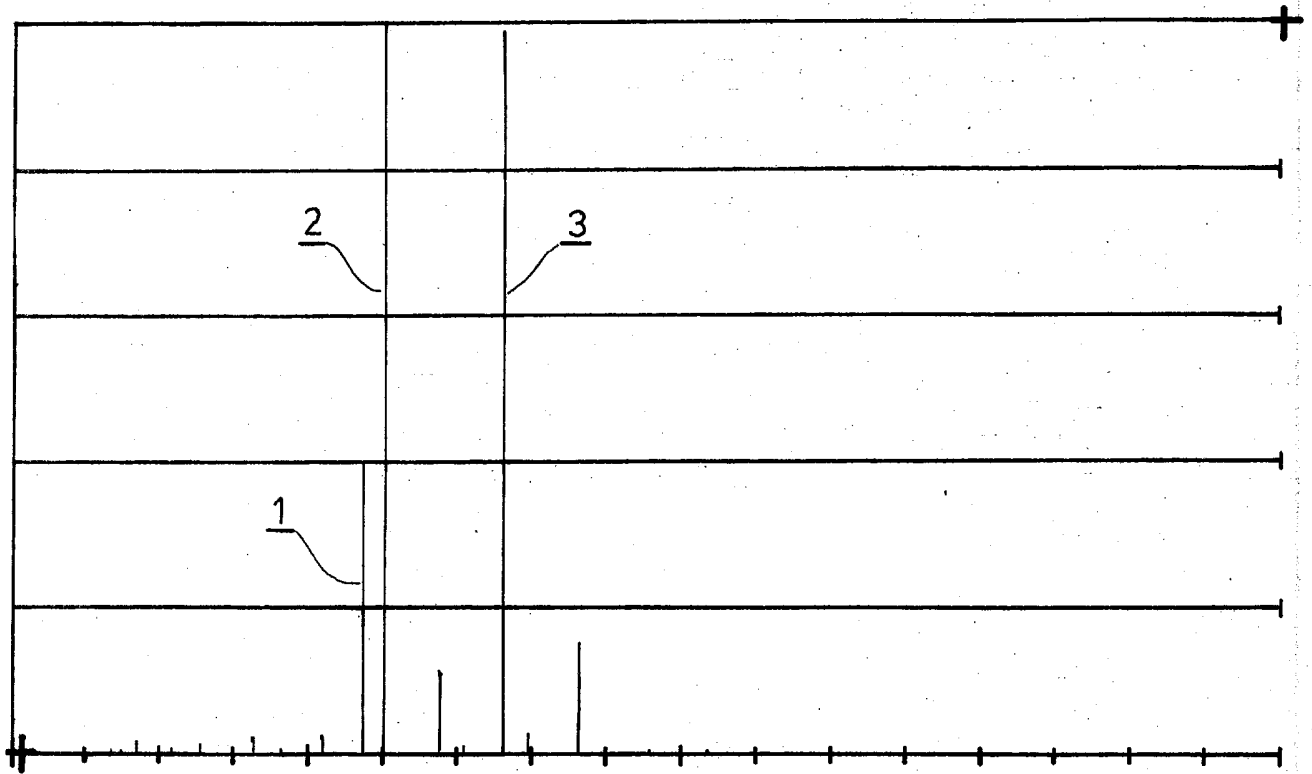
Zvláštní význam má tato metoda pro teoretické studie v taxonomii a genetice mikroorganismů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

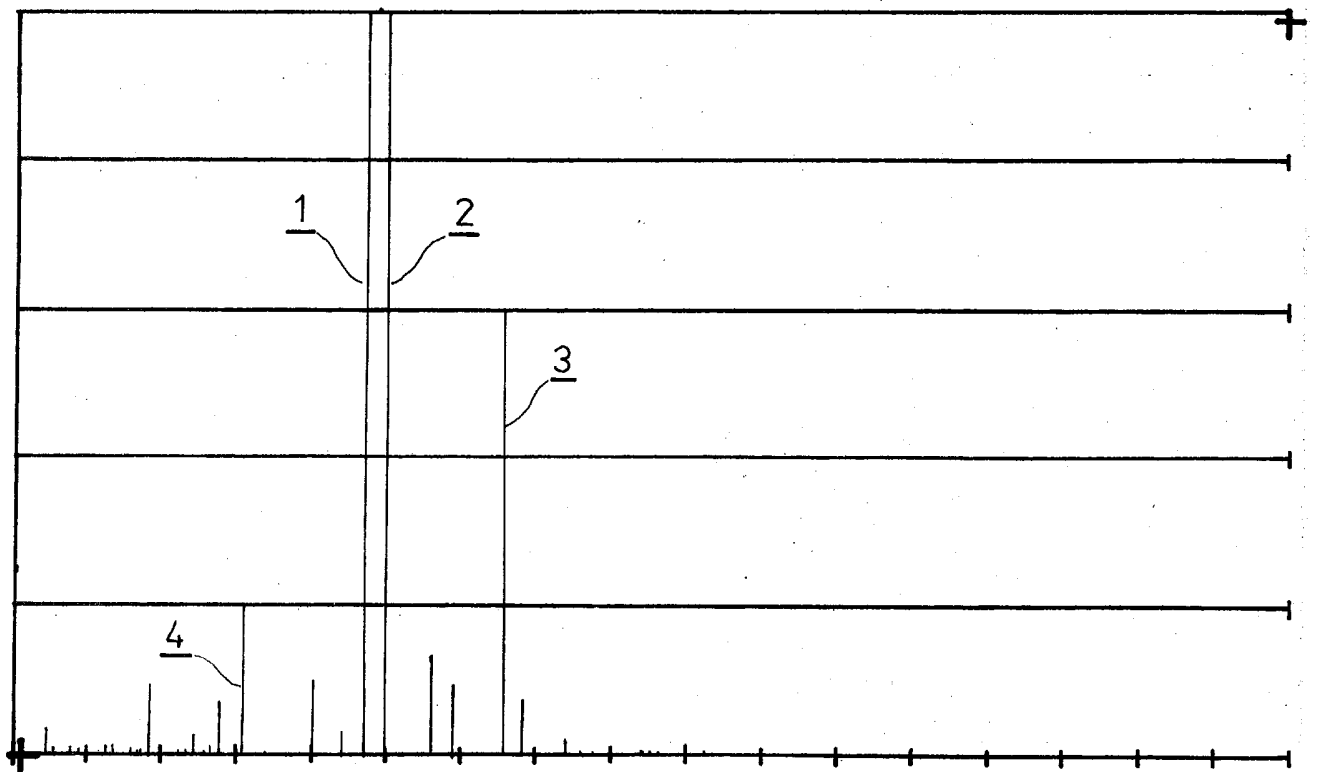
Způsob identifikace mikroorganismů pomocí chromatografie, při kterém se čistá kultura mikroorganismů kultivuje za konstantních podmínek až do dosažení stacionární fáze růstu, získaná biomasa se oddělí centrifugací, promyje a vysuší, vyznačený tím, že získaný vzorek se hydrolyzuje, například

v kyselém prostředí chlorovodíkem, popřípadě esterifikuje, například methylovým sodným a po extrakci se chromatograficky stanoví vzniklé organické kyseliny, nebo jejich estery, načež se provede porovnání získaných výsledků s výsledky, získanými u standardních kmenů mikroorganismů.

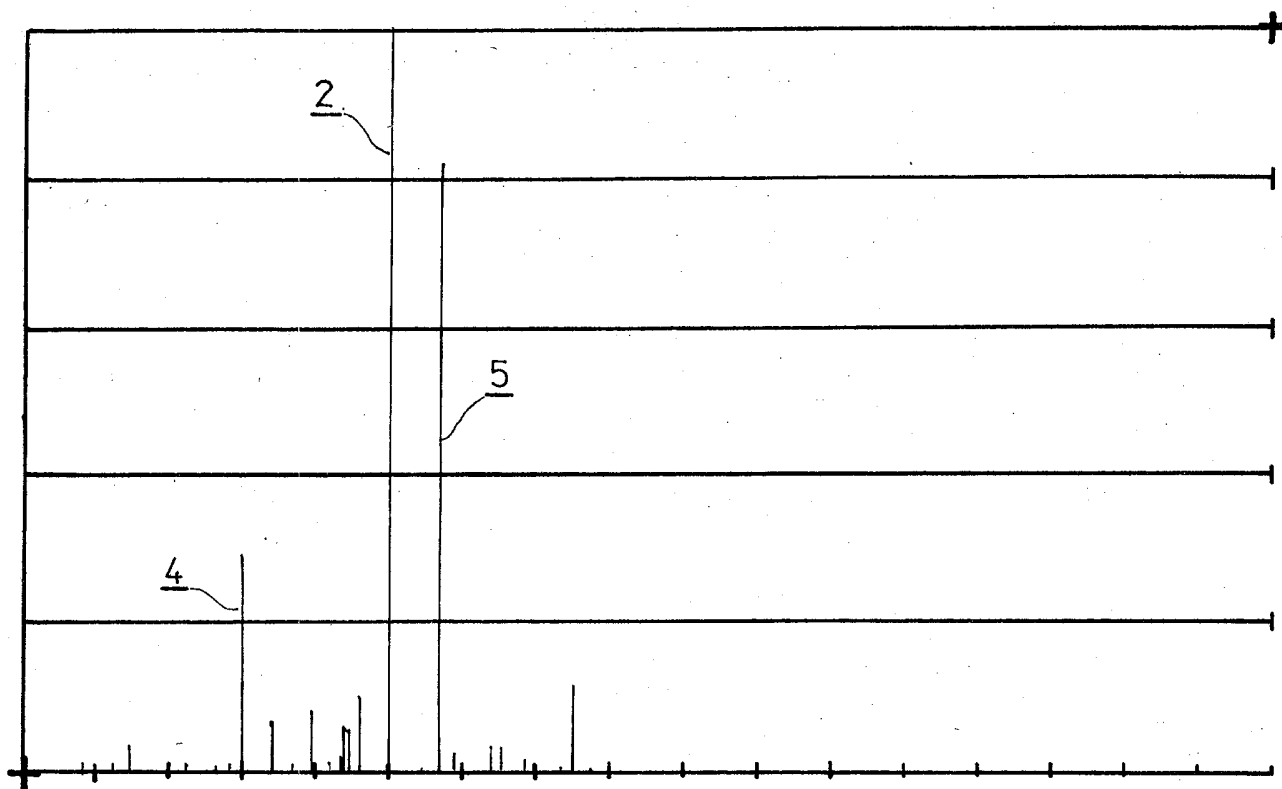
2 výkresy



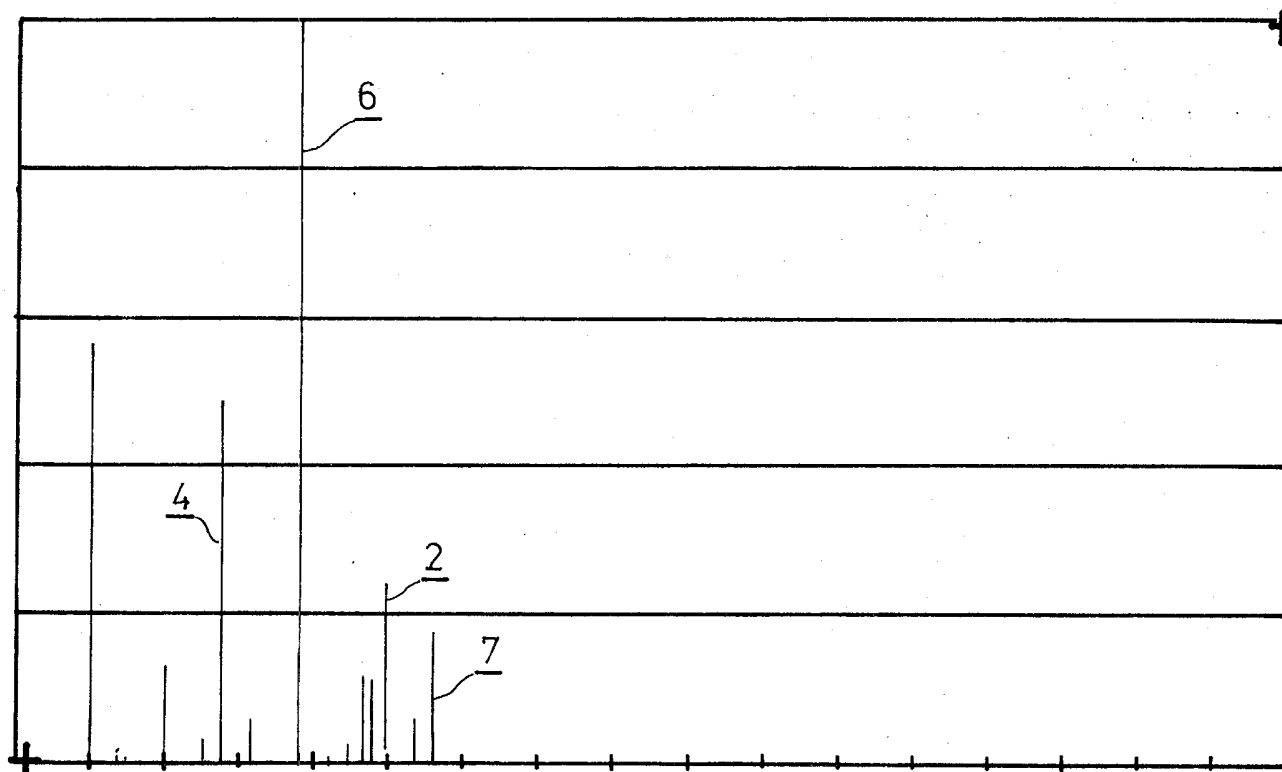
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4