

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 303 565

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/04* (2006.01)

*C12N 1/20* (2006.01)

*C12N 1/04* (2006.01)

*G01N 1/02* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLICA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-297**  
(22) Přihlášeno: **16.04.2010**  
(40) Zveřejněno: **26.10.2011**  
(**Věstník č. 43/2011**)  
(47) Uděleno: **31.10.2012**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.12.2012**  
(**Věstník č. 50/2012**)

(56) Relevantní dokumenty:

Lee SY. SMMP - a medium for selective isolation of Megasphaera and Pectinatus from the brewery. J. Am. Soc. Brew. Chem., 1994, 52(3), 115-119.; Lee SY et al. Selective-differential medium for isolation and differentiation of Pectinatus from other brewery microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 1981, 41(2), 386-387.; Haakensen M et al. Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of Lactobacillus and Pediococcus isolates. Int. J. Food Microbiol., 2009, 130, 56-60.; Lee SY et al. Pectinatus, a new genus of the family Bacteroidaceae. Int. J. Syst. Bacteriol., 1978, 28(4), 582-594.; Matoulková D. Striktně anaerobní bakterie v pivu a pivovarském provozu. Kvasný průmysl, 2008, 54, 338-343..

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha 2,  
CZ

(72) Původce:

Matoulková Dagmar Mgr., Trutnov, CZ  
Kosař Karel RNDr. CSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:

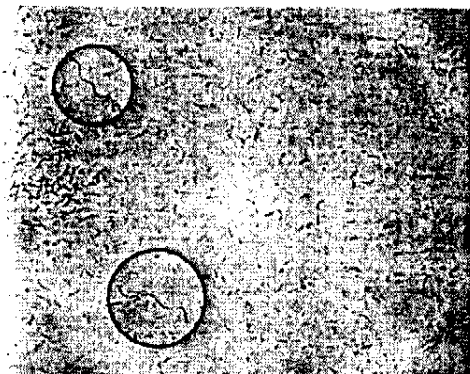
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.  
Dobroslav Musil, Cejl 38, Brno, 60200

(54) Název vynálezu:

**Kultivační půda pro kultivaci a identifikaci  
bakterií rodu Pectinatus a způsob odběru stěrů  
odběrovými tyčinkami**

(57) Anotace:

Řešení se týká kultivační půdy pro kultivaci a identifikaci bakterií rodu Pectinatus, zejména ve stěrech provedených v pivovarském provozu a/nebo na pivovarském zařízení, která obsahuje kvasničný extrakt v koncentraci 2 až 15 g/l, pepton v koncentraci 2 až 15 g/l, alespoň jeden zdroj energie v koncentraci 1 až 25 g/l, alespoň jednu látku snižující redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 1 g/l, nebo směs látek snižujících redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 3 g/l, přičemž koncentrace žádné z nich nepřesahuje 1 g/l, pufrující složku v koncentraci 1 až 3 g/l, masový extrakt v koncentraci 2 až 15 g/l zdroj síry a biogenních kovů tvořený směsí MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O v celkové koncentraci 0,025 až 0,25 g/l, nebo směsí FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O v celkové koncentraci 0,005 až 0,02 g/l, a izo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo jejich redukované hydrogenované deriváty v koncentraci 10 až 80 mg/l. Řešení se dále týká způsobu odběru stěrů odběrovými tyčinkami s odběrovou částí, jehož podstata spočívá v tom, že před provedením stěru je odběrová část odběrové tyčinky namočená v roztoku sterilované destilované vody s přídavkem látky snižující redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 3 g/l, a po provedení stěru se odebraný stěr umístí do shora uvedené kultivační půdy.



CZ 303565 B6

## Kultivační půda pro kultivaci a identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* a způsob odběru stěrů odběrovými tyčinkami

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká kultivační půdy pro kultivaci a identifikaci bakterií rodu *Pectinatus*, zejména ve stěrech provedených v pivovarském provozu a/nebo na pivovarském zařízení, která obsahuje kvasničný extrakt v koncentraci 2 až 15 g/l, pepton v koncentraci 2 až 15 g/l, látku ze skupiny glukóza, fruktóza, kyselina mléčná v koncentraci 1 až 25 g/l, alespoň jednu látku snižující redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 1 g/l, nebo směs látek snižujících redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 3 g/l, přičemž koncentrace žádné z nich nepřesahuje 1 g/l, a pufrující složku v koncentraci 1 až 3 g/l.

15 Vynález se dále týká způsobu odběru stěrů odběrovými tyčinkami s odběrovou částí.

### Dosavadní stav techniky

20 V důsledku úprav technologií pro stáčení piva, při kterých se snižuje obsah kyslíku v pivu až pod hranici 1 mg/l, rostoucí produkce některých druhů piv, které jsou ze své podstaty náchylnější k bakteriální kontaminaci, jako například piv méně chmelových, nízkoalkoholických, nealkoholických či nepasterovaných, a používání průtokové pasterizace či studené sterilizace piva, hrozí v současné době zvýšené riziko kontaminace piva anaerobními mikroorganismy. Tyto mikroorganismy se vyskytují převážně jako sekundární, tedy post-pasterizační kontaminanty, a tzv. „kazí“ pivo, když během svého životního cyklu produkují řadu chemických sloučenin (kyselinu propionovou, kyselinu octovou, sirovodík atd.), které negativně ovlivňují organoleptické vlastnosti piva, zvyšují jeho kyselost, a způsobují charakteristický masivní zákal a nepříjemný zápach. V krajním případě může dojít v důsledku nahromadění většího množství plynu vyprodukovaného těmito mikroorganismy dokonce k explozi láhve.

35 Z tohoto hlediska patří k nejvýznamnějším anaerobním mikroorganismům bakterie rodu *Pectinatus*, přičemž se odhaduje, že se v současné době podílí na více než 30 % případů zkažení baleného piva. Tyto bakterie jsou tolerantní vůči alkoholu až do 4,5 % (w/v), vůči sníženému pH až do hodnoty 3,7 i vůči hořkým chmelovým látkám, a i přesto, že se jedná o striktně anaerobní bakterie, jsou schopné přežít po nějakou dobu v aerosolu – viz. např. Helander I. M., Haikara A., Sadovskaya I., Vinogradov E., Salkinoja-Salonne M. S. (2004): „Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – lipopolysaccharides of a gram-positive genus“; FEMS Microbiol. Rev. 28: 543 až 552.

40 Přítomnost bakterií rodu *Pectinatus* v pivu a/nebo v pivovarském provozu či zařízení je však jen velmi těžko zjištělná, nebo vzhledem ke specifickým růstovým požadavkům těchto bakterií nelze pro jejich identifikaci použít konvenční membránovou filtraci. Dle článků Haikara A. (1984): „Detection of *Pectinatus* contaminants in beer.“ J. Am. Soc. Brew. Chem. 43 (1): 43 až 46, a Haikara A. (1985): „Detection of anaerobic, gram-negative bacteria in beer.“ Monats. Brauwiss. 6: 239 až 243 nelze bakterie rodu *Pectinatus* identifikovat ani při použití membránové filtrace, u které je použita předredukováná kultivační půda, a která probíhá v atmosféře CO<sub>2</sub>.

50 Ze stejných důvodů nelze použít ani kultivaci na běžných kultivačních půdách na Petriho miskách, ačkoliv řada státních i mezinárodních institucí tento postup doporučuje. Např. Evropská pivovarská konvence doporučuje použití neselektivních předredukových ztužených kultivačních půd typu MRS, NBB, PYF, Raka-Ray, SDA a UBA, či selektivní tekuté kultivační půdy SMMP, viz např. Analytic Microbiologica – EBC, 2005.

Nevýhodou použití neselektivních kultivačních půd výše uvedených typů je, že tyto půdy neza-  
braňují růstu dalších druhů mikroorganismů vyskytujících se ve zkaženém pivu a/nebo v pivo-  
varském prostřední a/nebo zařízení, přičemž tyto mikroorganismy (kvasinky, koliformní bakterie,  
bakterie mléčného kvašení, apod.) na kultivační půdě bakteriím rodu *Pectinatus* konkurují, potla-  
čují jejich kultivaci a případně je inhibují produkty svého metabolismu, změnou pH, apod.  
5 V důsledku toho není použití neselektivních kultivačních půd pro kultivaci a následnou identifi-  
kaci bakterií rodu *Pectinatus* dostatečně průkazné, a tedy ani vhodné pro použití v běžné pivo-  
varské praxi.

10 Použití těchto kultivačních půd je navíc doporučeno ve ztužené předredukované formě pro mem-  
bránovou filtraci a kultivaci v anaerobních podmínkách, v důsledku čehož mohou spolehlivě fun-  
govat pouze v případě, že je daná laboratoř vybavena anaerobním boxem s kontrolovanou atmos-  
férou  $N_2$  a  $H_2\mu$  který však není běžným vybavením pivovarských provozů.

15 Některé z těchto nevýhod částečně odstraňuje použití tekuté selektivní kultivační půdy typu  
SMMP. Při tom sice dochází díky obsahu látek snižujících redoxpotenciál a antibiotik (např.  
aktinon) k inhibici růstu kvasinek, avšak stanovení přítomnosti bakterií rodu *Pectinatus* vyžaduje  
sledování vyšetřovaného piva, tvorby zákalu v něm a změny zbarvení kultivační půdy po dobu 14  
dní. To je doba, která je pro použití v pivovarském prostřední naprosto nevhodná. Tato kultivační  
20 půda je navíc primárně určena pouze pro kultivaci a identifikaci bakterií přímo ve zkaženém  
pivu, a není vhodná pro kultivaci bakterií rodu *Pectinatus* ze stěrů provedených na pivovarském  
zařízení a/nebo v pivovarském prostoru.

25 V článku Lee S. Y., Moore S. E., Mabee M. S.: „Selective-differential medium for isolation and  
differentiation of *Pectinatus* from other brewery microorganisms“. Appl. Environ. Microbiol. 2:  
386 až 387, 1981 je pro kultivaci a následnou identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* navrženo pou-  
žití tzv. LL-agaru, u kterého se přítomnost těchto bakterií projevuje černým zbarvením  
v důsledku chemické reakce bakteriemi vytvářeného sirovodíku s octanem olovnatým přítomným  
v kultivační půdě. Nevýhodou použití tohoto kultivačního média je nutnost použití tzv. Leeho  
30 zkumavek s dvojitou stěnou, které nejsou běžně dostupné, a s tím související vysoké pořizovací i  
provozní náklady. Kromě toho je tento způsob kultivace a identifikace bakterií rodu *Pectinatus*  
časově poměrně náročný na přípravu (obvykle 5 až 6 dní), a neumožňuje detekci těchto bakterií  
při jejich nízkém počtu ve vzorku.

35 Pro odstranění výše uvedených nevýhod konvenčních technik bylo v odborné literatuře a  
v patentových spisech, např. v JP 2004121259, JP 2005006556 či US 5 869 642 dále navrženo  
několik metod pro identifikaci bakterií rodu *Pectinatus*, které jsou založeny na detekci specific-  
kých oblastí DNA těchto bakterií. Tyto metody jsou však časově i finančně velmi náročné, neboť  
40 ke svému provádění vyžadují nejen odborný personál, který ovládá složité molekulární techniky,  
ale také specifické laboratorní vybavení. Samotné identifikaci přitom obvykle předchází kultiva-  
ce a izolace bakterií, případně i další kroky, v důsledku čehož může celý proces trvat až několik  
dní. Výstupy těchto metod navíc nejsou ve většině případů jednoznačné, takže může dojít  
k falešné pozitivní/negativní identifikaci. Díky tomu jsou i tyto metody nevhodné pro použití  
v běžném pivovarském provozu.

45 Vzhledem k výše popsaným nevýhodám se pro identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* v pivu  
a/nebo v pivovarském provozu a/nebo zařízení v současné době používá tzv. „forcing test“. Při  
tomto testu se odebraný vzorek inokuluje do piva obohaceného o látky podporující růst bakterií  
rodu *Pectinatus*, a uzavřené lahve se inkubují při teplotě 28 až 30 °C. Přitom se po dobu 1 až  
50 6 týdnů od inokulace sleduje tvorba zákalu, která je průvodním jevem přítomnosti bakterií rodu  
*Pectinatus*. Nevýhody tohoto postupu jsou nasnadě. Patří k nim zejména dlouhá doba potřebná  
pro kultivaci a identifikaci, pracnost tohoto postupu, kdy je nutné jednotlivé obohacující složky  
přidávat do piva sterilně, a vzhledem k velikosti pivních lahví také zvýšené nároky na objem  
biologických inkubátorů.

55

Z článku Lee SY. SMMP – a medium for selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* from the brewery. J. Am. Soc. Brew. Chem. 1994, 52(3), 115 až 119 je dále známo složení specifické kultivační půdy umožňující kultivaci a následnou detekci bakterií rodu *Megasphaera* a *Pectinatus*. Nevýhodou této kultivační půdy je, že díky jejímu chemickému složení je možné ji použít pouze pro detekci těchto bakterií ve vzorcích piva a nikoliv např. ve stěrech provedených na pivovarském provozu a/nebo zařízení. Další nevýhodou je, že trvá poměrně dlouhou dobu – nejméně 2 až 3 dny od zaočkování, než dojde k takové kultivaci těchto bakterií, která umožňuje jejich identifikaci. Díky tomu se tato kultivační půda nehodí pro praktické využití v pivovarském provozu.

Cílem vynálezu tak je navrhnout kultivační půdu pro kultivaci a následnou identifikaci bakterií rodu *Pectinatus*, která by byla použitelná v běžném pivovarském provozu bez nutnosti pořízování speciálního laboratorního vybavení, a jejíž využití by maximálně zkrátilo dobu potřebnou pro identifikaci těchto bakterií. Využití této kultivační půdy by současně nemělo být omezeno pouze na identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* v kontaminovaném pivu, ale mělo by umožnit jejich identifikaci i ve stěrech odebraných v pivovarském provozu a/nebo z pivovarského zařízení.

### Podstata vynálezu

Cíle vynálezu je dosaženo kultivační půdou pro kultivaci a identifikaci bakterií rodu *Pectinatus*, zejména ve stěrech provedených v pivovarském provozu a/nebo na pivovarském zařízení, která obsahuje kvasničný extrakt v koncentraci 2 až 15 g/l, pepton v koncentraci 2 až 15 g/l, látku ze skupiny glukóza, fruktóza, kyselina mléčná v koncentraci 1 až 25 g/l, alespoň jednu látku snižující redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 1 g/l, nebo směs látek snižujících redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 3 g/l, přičemž koncentrace žádné z nich nepřesahuje 1 g/l, a pufrující složku v koncentraci 1 až 3 g/l, jejíž podstata spočívá v tom, že dále obsahuje masový extrakt v koncentraci 2 až 15 g/l, zdroj síry a biogenních kovů tvořený směsí  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  a  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  v celkové koncentraci 0,025 až 0,25 g/l, nebo směsí  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  a  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  v celkové koncentraci 0,005 až 0,02 g/l, a izo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo jejich redukované hydrogenované deriváty v koncentraci 10 až 80 mg/l. Toto složení kultivační půdy umožňuje kultivaci a následnou identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* i ve vzorcích, které neobsahují izomerované chmelové kyseliny, tedy například ve stěrech provedených v pivovarském provozu nebo na pivovarském zařízení, apod. Izo- $\alpha$ -kyseliny přitom svou přítomností stimulují kultivaci bakterií rodu *Pectinatus* a současně úplně nebo alespoň částečně inhibují kultivaci konkurenčních mikroorganismů. Bakterie rodu *Pectinatus* pak lze sledovat a identifikovat již po 24 hodinách od zaočkování, a to pouze při použití běžného mikroskopu.

Nejvhodnější koncentrace izo- $\alpha$ -kyselin a/nebo jejich redukovaných hydrogenovaných derivátů přitom byla během experimentů stanovena na 50 mg/l.

Při použití kultivační půdy podle vynálezu jako odběrové nebo transportní obsahuje tato kultivační půda dále 0,05 až 0,3 % hmotnostních agaru, který omezuje její okysličování během manipulace a transportu.

Jako redukované hydrogenované deriváty izo- $\alpha$ -kyselin obsahuje kultivační půda podle vynálezu tetrahydroizo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo dihydroizo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo hexahydroizo- $\alpha$ -kyseliny.

Aby bylo při použití kultivační půdy podle vynálezu dosaženo co nejlepších výsledků, je dále výhodným pokud je v kombinaci s ní současně použit způsob odběru stěrů odběrovými tyčinkami s odběrovou částí podle vynálezu. Jeho podstata přitom spočívá v tom, že před provedením stěru je odběrová část odběrové tyčinky namočena v roztoku sterilované destilované vody s přídatkem látky snižující redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 3 g/l, a odebraný stěr se umístí do kultivační půdy podle vynálezu.

Jako látku snižující redoxpotenciál přitom lze použít cystein hydrochlorid, thioglykolát sodný nebo kyselinu askorbovou v koncentraci 0,25 až 1 g/l, případně směs alespoň dvou těchto látek, přičemž koncentrace žádné z nich nepřesahuje hodnotu 1 g/l.

5

#### Přehled obrázků na výkresech

Výkres ukazuje na obr. 1 snímek kultivační půdy 24 hodin po zaočkování stěru obsahujícího mj. bakterie rodu *Pectinatus* provedeného z pivovarského zařízení, a na obr. 2 snímek kultivační půdy podle vynálezu 24 hodin po zaočkování stejného stěru z pivovarského zařízení.

10

#### Příklady provedení vynálezu

Kultivační půda podle vynálezu svým složením stimuluje kultivaci anaerobních bakterií rodu *Pectinatus* a současně inhibuje kultivaci konkurenčních mikroorganismů. Při současném zaočkování bakterií rodu *Pectinatus* a bakterií mléčného kvašení (k čemuž v praxi běžně dochází), tak lze již po 24 hodinách sledovat prostřednictvím běžného mikroskopu typické protáhlé buňky bakterií rodu *Pectinatus* s charakteristickým hadovitým pohybem, a podle těchto projevů je bezpečně identifikovat. Bakterie mléčného kvašení jsou přitom složením kultivační půdy podle vynálezu zcela nebo alespoň částečně inhibovány, takže kultivaci ani identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* nijak nebrání. Kultivační půda podle vynálezu je přitom dle potřeby použitelná jako odběrová, transportní i jako diagnostická. Její složení je obecně uvedeno v Tabulce 1; její pH se přitom pohybuje v rozmezí 5,5 až 5,9.

25

Tabulka 1

	<b>Složka kultivační půdy podle vynálezu</b>	
<i>a</i>	Zdroj uhlíku, dusíku, aminokyselin a vitamínů	MRS
<i>b</i>	Zdroj síry a biogenních kovů	
<i>c</i>	Pufující složka	
<i>d</i>	Složka snižující redoxpotenciál	
<i>e</i>	Izo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo jejich deriváty	

30

Kultivační půda podle vynálezu může být snadno a levně připravena smícháním jednotlivých složek *a* až *e* uvedených v Tabulce 1 v požadovaném poměru. Avšak vzhledem k tomu, že složky *a*, *b* a *c* jsou již ve vhodné koncentraci obsaženy ve stávající a komerčně dostupné neselektivní kultivační půdě typu MRS, je alespoň v některých případech výhodnější, když se tato neselektivní kultivační půda použije jako základ kultivační půdy podle vynálezu, ke kterému se pouze dodají zbývající složky *d* a *e*. Neselektivní kultivační půda typu MRS sice kromě složek *a*, *b* a *c* obsahuje také další složky, jako např. povrchově aktivní látku – polyoxyethylen (20) sorbitan monooleát (označovaný komerčně jako Tween 80 nebo Polysorbate 80) v koncentraci 1 g/l, a selektivní složky sloužící zároveň jako zdroj energie pro některé mikroorganismy – směs citrátu amonného v koncentraci 2 g/l a CH<sub>3</sub>COONa v koncentraci 5 g/l, avšak jejich přítomnost nijak neovlivňuje požadovaný účinek připravované kultivační půdy podle vynálezu, ani nebrání kultivaci či identifikaci bakterií rodu *Pectinatus*. Tyto složky nemusí být při jiných postupech přípravy kultivační půdy podle vynálezu použity ani nahrazeny jinými látkami se stejnou nebo podobnou funkcí.

45

Složka *a* – zdroj uhlíku, dusíku, aminokyselin a vitamínů, je tvořena buď jednou vhodnou látkou, nebo častěji směsí dvou či více různých látek. V případě použití neselektivní kultivační půdy typu MRS jako základu kultivační půdy podle vynálezu se jedná o směs peptonu v koncentraci 10 g/l, masového extraktu v koncentraci 10 g/l, kvasničného extraktu v koncentraci 5 g/l a glukózy v koncentraci 20 g/l. Pokud je však kultivační půda podle vynálezu připravována smícháním jednotlivých složek, lze použít peptony, masové extrakty a kvasničné extrakty v libovolné koncentraci v rozmezí 2 až 15 g/l, případně jiné látky se stejnou nebo podobnou funkcí, přičemž např. pepton může být plnohodnotně nahrazen tryptonem, enzymatickým hydrolyzátem kaseinu, apod. Glukóza přitom může být použita v libovolné koncentraci 1 až 25 g/l, případně může být nahrazena fruktózou, kyselinou mléčnou apod., atd.

Složka *b* – zdroj síry a biogenních kovů, je tvořena buď jednou vhodnou látkou, nebo častěji směsí dvou, případně i více různých látek. V případě použití neselektivní kultivační půdy typu MRS se jedná o směs  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  v koncentraci 0,2 g/l a  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  v koncentraci 0,05 g/l. Pokud je kultivační půda podle vynálezu připravována smícháním jednotlivých složek, lze použít stejné látky v koncentraci v rozmezí 0,025 až 0,25 g/l, případně jiné látky se stejnou nebo podobnou funkcí, např.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  v koncentraci v rozmezí 0,005 až 0,02 g/l apod., nebo směs dvou či více vhodných látek.

Složka *c* – pufrující složka, je obvykle tvořena jednou látkou. V případě použití neselektivní kultivační půdy typu MRS se jedná o  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  v koncentraci 2 g/l. Pokud je však kultivační půda podle vynálezu připravována smícháním jednotlivých složek, lze použít  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  v koncentraci v rozmezí 1 až 3 g/l, případně jinou látku se stejnou nebo podobnou funkcí, např.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , apod., nebo směs dvou či více vhodných látek.

Složka *d* – složka snižující redoxpotenciál, svou přítomností v kultivační půdě podle vynálezu snižuje její redoxpotenciál, a tím umožňuje kultivaci striktně anaerobních mikroorganismů, jako jsou bakterie rodu *Pectinatus*. Jedná se přitom buď o jednu látku, nejčastěji cystein hydrochlorid, kyselinu askorbovou nebo thioglykolát sodný, jejíž koncentrace v kultivační půdě podle vynálezu se pohybuje v rozmezí 0,25 až 1 g/l, případně o směs těchto látek, jejíž koncentrace v kultivační půdě podle vynálezu se pohybuje od 0,25 g/l do 3 g/l, přičemž koncentrace žádné z látek nepřesahuje hodnotu 1 g/l. Kromě uvedených látek lze v dalších variantách k tomuto účelu použít také jiné látky se stejnými nebo podobnými účinky, případně směs takových látek.

Složka *e* – izo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo jejich deriváty, svou přítomností dále stimuluje kultivaci bakterií rodu *Pectinatus* a současně úplně nebo částečně inhibuje kultivaci konkurenčních mikroorganismů. Do této skupiny patří izo- $\alpha$ -kyseliny (jedná se o směs izomerů trans- a cis-) a jejich redukované hydrogenované deriváty, případně jejich směsi. Jako nejvýhodnější se jeví použití tetrahydroizo- $\alpha$ -kyselin, avšak kromě nich lze se stejnými výsledky použít také dihydroizo- $\alpha$ -kyseliny, nebo hexahydroizo- $\alpha$ -kyseliny, směsi těchto redukovaných dehydrogenovaných derivátů izo- $\alpha$ -kyselin, nebo libovolné směsi izo- $\alpha$ -kyselin a jejich redukovaných hydrogenovaných derivátů. Koncentrace této složky v kultivační půdě podle vynálezu se pohybuje v rozmezí 10 až 80 mg/l, přičemž s výhodou dosahuje 50 mg/l.

Další složkou kultivační půdy podle vynálezu, která je však využita pouze v některých jejích variantách, je agar. Jeho přítomnost v kultivační půdě podle vynálezu omezuje její prokysličování během manipulace či transportu, a tím se podílí na vytvoření podmínek vhodných pro existenci anaerobních mikroorganismů. Kultivační půda podle vynálezu, která je určena výhradně pro přímé použití v laboratoři však nemusí agar vůbec obsahovat.

K ověření účinnosti kultivační půdy podle vynálezu byla provedena řada srovnávacích experimentů, při kterých byla použita neselektivní kultivační půda typu MRS a několik variant kultivační půdy podle vynálezu vytvořených kombinací neselektivní kultivační půdy typu MRS a složek *d* a *e* v různých koncentracích. Konkrétní složení testovaných kultivačních půd je uvedeno v tabulce 2.

Tabuika 2

Složka	Látka	Množství složek kultivační půdy v 1000 ml destilované vody					
		A (MRS)	B	C	D	E	F
a	Pepton	10,0 g	10,0 g	10,0 g	10,0 g	10,0 g	10,0 g
	Masový extrakt	10,0 g	10,0 g	10,0 g	10,0 g	10,0 g	10,0 g
	Kvasničný extrakt	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g
	Glukóza	20,0 g	20,0 g	20,0 g	20,0 g	20,0 g	20,0 g
-	Tween 80	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g
-	Polyoxyethylen(20) sorbitan monooleát)	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g
	Citrát amonný	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g
	CH <sub>3</sub> COONa	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
b	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g
c	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g
	Cystein hydrochlorid	-	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g
d	Thioglykolát sodný	-	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g
	Tetrahydroizo- $\alpha$ -kyseliny	-	-	10 mg	35 mg	50 mg	50 mg
e	Agar	-	0,1-0,2 %	0,1-0,2 %	0,1-0,2 %	0,1-0,2 %	0,1-0,2 %

5

Nejprve byl sledován vliv různé koncentrace složek *d* a *e* v kultivační půdě podle vynálezu na kultivaci nejběžnějších kmenů bakterií rodu *Pectinatus*.

## Příklad 1

5 Složky kultivační půdy ve variantách A až F dle Tabulky 2 byly rozmíchány v 1000 ml destilované vody a výsledný roztok byl po 10 ml rozlit do bakteriologických zkumavek, které byly následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo do všech variant kultivační půdy v bakteriologických zkumavkách zaočkováno 0,1 ml husté suspenze tří sbírkových kmenů bakterií rodu *Pectinatus*, konkrétně *Pectinatus frisingensis* DSM 20465, *Pectinatus frisingensis* CCM 6217 a *Pectinatus sp.* RIBM 2–86. Po 24 hodinách inkubace při 10 teplotě 28 °C byla vyhodnocena tvorba zákalu a sedimentu, a provedena mikroskopie každé varianty kultivační půdy A až F.

15 U kultivační půdy ve variantě A (MRS) nebyl pozorován žádný zákal. Při mikroskopii byla jen náhodně sledována přítomnost velmi malého počtu bakterií rodu *Pectinatus*.

18 U kultivační půdy ve variantě B byl pozorován silný zákal, který je průvodním jevem přítomnosti bakterií rodu *Pectinatus*. Při mikroskopii byla potvrzena dobrá kultivace těchto bakterií, které byly bez dalšího snadno a bezpečně identifikovatelné na základě svého typického hadovitěho tvaru a pohybu.

20 U kultivační půdy ve variantách C až F byl také pozorován silný zákal. Mikroskopie potvrdila velmi dobrou kultivaci bakterií rodu *Pectinatus*, které byly snadno a bezpečně identifikovatelné na základě svého typického hadovitěho tvaru a pohybu.

25 Následně byl sledován vliv různé koncentrace složek *d* a *e* v kultivační půdě podle vynálezu na kultivaci nejběžnějších kmenů bakterií mléčného kvašení.

## Příklad 2

30 Varianty kultivační půdy A až F byly připraveny stejným způsobem jako v příkladu 1. Do všech variant kultivační půdy bylo zaočkováno 0,1 ml husté suspenze 25 sbírkových kmenů nejběžnějších bakterií mléčného kvašení. V daném případě se jednalo o kmeny bakterií rodu *Lectobacillus* ze sbírky VÚPS. Po 24 hodinách inkubace při teplotě 28 °C byla vyhodnocena tvorba zákalu a sedimentu, a provedena mikroskopie každé varianty kultivační půdy A až F.

35 U kultivační půdy ve variantě A (MRS) byl pozorován silný zákal, který je průvodním jevem přítomnosti bakterií mléčného kvašení. Při mikroskopii pak byla potvrzena velmi dobrá kultivace všech kmenů bakterií mléčného kvašení.

40 U kultivační půdy ve variantě B byl také pozorován silný zákal. Při mikroskopii byla potvrzena dobrá kultivace všech kmenů bakterií mléčného kvašení.

45 U kultivační půdy ve variantě C byl pozorován silný zákal v 19 zkumavkách. Při mikroskopii pak byla potvrzena kultivace 19 kmenů bakterií mléčného kvašení. Ve srovnání s kultivační půdou ve variantě A a B bylo tedy složením kultivační půdy podle vynálezu inhibováno 6 kmenů bakterií mléčného kvašení.

50 U kultivační půdy ve variantě D byl pozorován silný zákal v 10 zkumavkách. Při mikroskopii pak byla potvrzena kultivace pouze 10 kmenů bakterií mléčného kvašení. Ve srovnání s kultivačními půdami ve variantě A a B bylo tedy složením kultivační půdy podle vynálezu inhibováno 15 kmenů bakterií mléčného kvašení.



U kultivační půdy ve variantě E a F nebyl pozorován žádný zákal. Při mikroskopii nebyla potvrzena kultivace žádného ze zaočkovaných kmenů bakterií mléčného kvašení. Všech 25 kmenů bakterií mléčného kvašení tedy bylo složením kultivační půdy podle vynálezu inhibováno.

- 5 Dále byl sledován vliv různé koncentrace složek *d* a *e* v kultivační půdě podle vynálezu na paralelní kultivaci bakterií rodu *Pectinatus* a bakterií mléčného kvašení, a na možnosti identifikace bakterií rodu *Pectinatus* při mikroskopii.

### 10 Příklad 3

Varianty kultivační půdy A až F byly připraveny stejným způsobem jako v příkladu 1. Do všech variant kultivační půdy bylo zaočkováno 0,1 ml husté suspenze bakterií rodu *Pectinatus sp.* RIBM 2-86 dle příkladu 1, a současně 0,1 ml husté suspenze 25 sbírkových kmenů bakterií mléčného kvašení uvedených v příkladu 2. Po 24 hodinách inkubace při teplotě 28 °C byla vyhodnocena tvorba zákalu a sedimentu, a provedena mikroskopie každé varianty kultivační půdy A až F.

20 U kultivační půdy ve variantě A (MRS) byl pozorován silný zákal. Při mikroskopii pak byla potvrzena velmi dobrá kultivace všech kmenů bakterií mléčného kvašení. Bakterie rodu *Pectinatus* nebyly vůbec pozorovány.

25 U kultivační půdy ve variantě B byl pozorován silný zákal. Při mikroskopii byla potvrzena dobrá kultivace všech kmenů bakterií mléčného kvašení, přičemž náhodně bylo možné sledovat také bakterie rodu *Pectinatus*.

30 U kultivační půdy ve variantě C až F byl také pozorován silný zákal. Při mikroskopii byly zcela zřetelně pozorovány typické buňky s hadovitým tvarem i pohybem, což jsou charakteristické znaky bakterií rodu *Pectinatus*, na základě nichž lze tyto bakterie zcela bezpečně identifikovat. U kultivační půdy variant C a D sice došlo současně i ke kultivaci některých kmenů bakterií mléčného kvašení, ale jejich přítomnost nebránila bezpečně identifikaci bakterií rodu *Pectinatus*. U variant E a F již bakterie rodu *Pectinatus* ve vzorku zcela převládaly.

35 V dalších experimentech byly používány pouze varianty kultivační půdy podle vynálezu C až F, přičemž byla testována možnost jejich použití pro kultivaci a identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* přímo ve vzorku zkaženého piva.

### 40 Příklad 4

Kultivační půda podle vynálezu ve variantách C až F byla připravena a sterilizována stejně jako v příkladu 1. Vzhledem k tomu, že kultivace a následná identifikace bakterií rodu *Pectinatus* probíhala v laboratoři, neobsahovala kultivační půda podle vynálezu v žádné z variant agar.

45 Ode dna nádoby s pivem infikovaným bakteriemi rodu *Pectinatus* a dalšími mikroorganismy bylo odebráno 0,1 ml piva a pipetováno do každé ze zkumavek s 10 ml příslušné varianty kultivační půdy. Po 24 hodinách kultivace při teplotě 28 až 30 °C byla provedena mikroskopie, při které byly bakterie rodu *Pectinatus* bezpečně identifikovány na základě přítomnosti buněk s typickým hadovitým tvarem a pohybem ve všech variantách kultivační půdy podle vynálezu. Tím byla potvrzena možnost využití kultivační půdy podle vynálezu ke kultivaci a následné identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* přímo v kontaminovaném pivu.

50 U variant C až F kultivační půdy podle vynálezu a u varianty kultivační půdy B byla dále testována možnost kultivace a následné identifikace bakterií rodu *Pectinatus* ve stěrech provedených

přímo v pivovarském zařízení, ve kterém byla existence bakterií rodu *Pectinatus* předem potvrzena metodami známými ze stavu techniky.

#### Příklad 5

5 Kultivační půda podle vynálezu ve variantách C až F a kultivační půda ve variantě B, byly připraveny a sterilizovány stejně jako v příkladu 1. Stěry provedené v pivovarském prostředí byly po odběru zaočkovány do všech variant kultivační půdy a transportovány do laboratoře. Po 24 hodinách kultivace při teplotě 28 až 30 °C byla provedena mikroskopie.

10 V kultivační půdě ve variantě B byly přítomny různé mikroorganismy typické pro pivovarské prostředí, zejména kvasinky a další bakterie kulového nebo protáhlého tvaru. Některé z pohyblivých bakterií protáhlého tvaru přitom bylo možno považovat z bakterie rodu *Pectinatus*, ale jejich identifikace nebyla dostatečně spolehlivá, neboť tyto bakterie nevykazovaly typický hadovitý pohyb.

15 Na obr. 1 je pro názornost uvedena fotografie z mikroskopu při 630 násobném zvětšení.

20 V kultivační půdě podle vynálezu ve variantách C až F však již jasně převažovaly typické bakterie s hadovitým tvarem a pohybem, které bylo možné zcela bezpečně identifikovat jako bakterie rodu *Pectinatus*. Většina ostatních mikroorganismů přitom byla inhibována, nebo svou přítomností nebránila identifikaci.

25 Na obr. 2 je pro názornost uvedena fotografie z mikroskopu při 630 násobném zvětšení získaná při mikroskopii kultivační půdy podle vynálezu ve variantě F.

30 Z provedených experimentů vyplývá, že kultivační půda podle vynálezu, která obsahuje základní složky jako zdroj uhlíku, zdroj dusíku, zdroj aminokyselin, zdroj vitamínů, zdroj síry, zdroj biogenních kovů a pufrující složku doplněné o malé množství specifických složek, jako látky snižující redoxpotenciál (v daném případě směs 0,25 g cystein hydrochloridu a 0,25 g thioglykolátu sodného) a redukováného dehydrogenovaného derivátu izo- $\alpha$ -kyselin (v daném případě 10 mg tetrahydroizo- $\alpha$ -kyselin), je využitelná pro identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* jak při přímém zaočkování čisté kultury těchto bakterií, tak i při zaočkování kultury obsahující směs různých rodů bakterií získaných ze zkaženého piva nebo ze stěrů provedených v pivovarském prostředí a/nebo na pivovarském zařízení. Identifikace bakterií rodu *Pectinatus* při použití kultivační půdy podle vynálezu přitom může probíhat již po pouhých 24 hodinách od zaočkování, takže je několikrát rychlejší než dosud používané techniky. Tento postup navíc nevyžaduje pořízení speciálního laboratorního zařízení, neboť bakterie rodu *Pectinatus* lze spolehlivě identifikovat při mikroskopii kultivační půdy podle vynálezu běžným optickým mikroskopem.

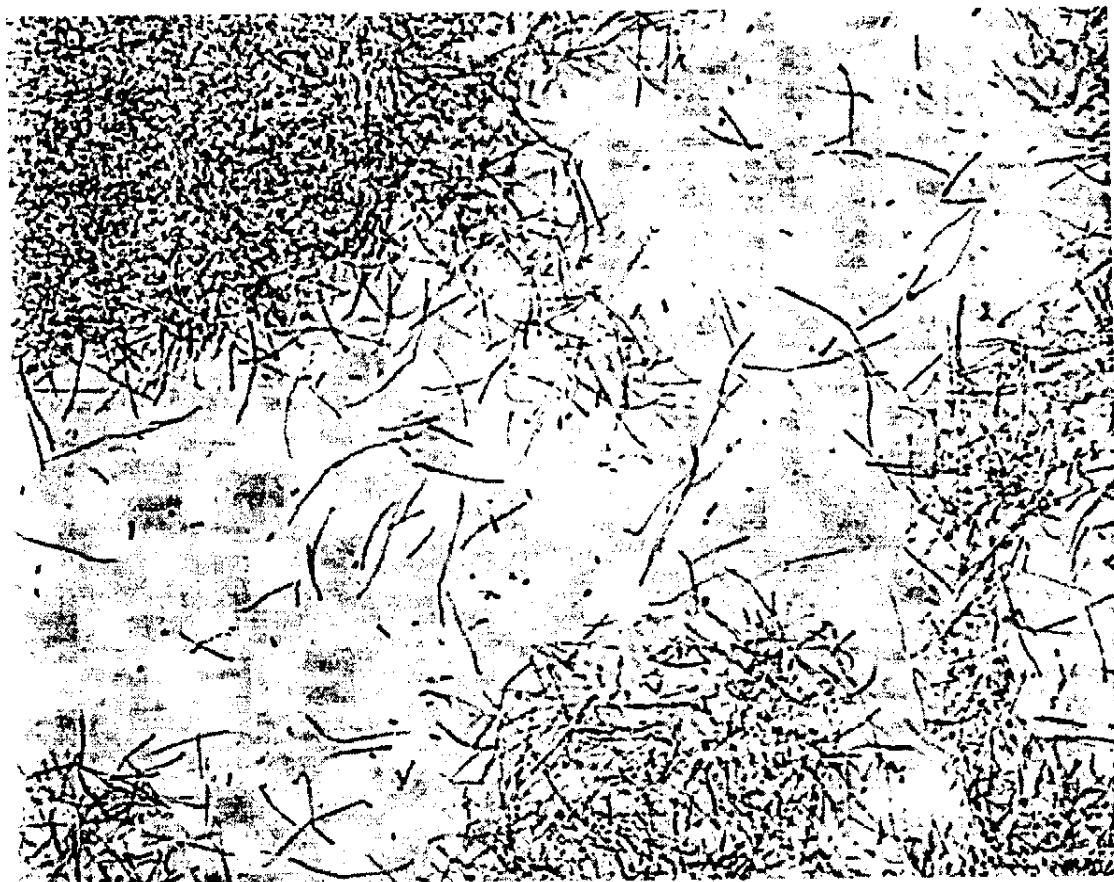
40 V dalších variantách může kultivační půda podle vynálezu obsahovat další pomocné složky, které však nejsou pro její funkci podstatné. Jedná se např. o zdroje solí, jako např. NaCl, KCl, apod. v koncentraci 1 až 3 g/l acidobazické indikátory, jako např. chlorfenolová červeň v koncentraci 0,05 až 0,1 g/l, oxidačně-redukční indikátory, jako např. methylenová modř, resazurin, apod. v koncentraci 0,001 až 0,003 g/l, atd.

50 Pro dosažení co nejlepších výsledků při identifikaci bakterií rodu *Pectinatus* je dále výhodné, pokud se stěry prováděné v pivovarském provozu a/nebo zařízení, případně i jinde, provádí odběrovými tyčinkami, jejichž odběrová část se před provedením stěru navlhčí ve sterilní destilované vodě s přísadkou látky snižující redoxpotenciál v koncentraci v rozmezí 0,25 až 1 g/l, případně směsi několika stopových látek v koncentraci 0,25 až 3 g/l, přičemž koncentrace žádné z těchto látek nepřesahuje hodnotu 1 g/l. Látkou snižující redoxpotenciál je přitom s výhodou cystein hydrochlorid, avšak použitelné jsou i jiné látky se stejným účinkem, například thioglykolát sodný, kyselina askorbová, atd. případně směs takových látek. Takto odebraný stěr se ihned po odebrání umístí do kultivační půdy podle vynálezu.

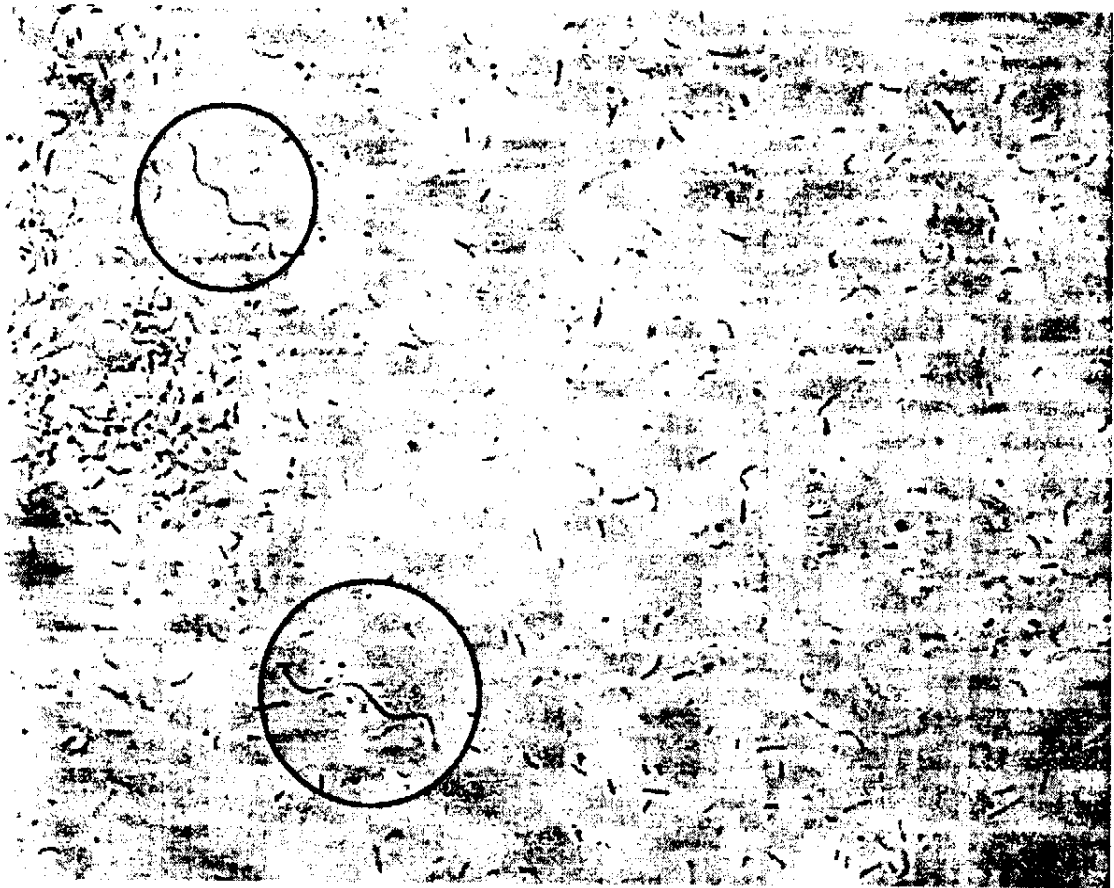
## PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kultivační půda pro kultivaci a identifikaci bakterií rodu *Pectinatus*, zejména ve stěrech provedených v pivovarském provozu a/nebo na pivovarském zařízení, která obsahuje kvasničný extrakt v koncentraci 2 až 15 g/l, pepton v koncentraci 2 až 15 g/l, látku ze skupiny glukóza, fruktóza, kyselina mléčná v koncentraci 1 až 25 g/l, alespoň jednu látku snižující redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 1 g/l, nebo směs látek snižujících redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 3 g/l, přičemž koncentrace žádné z nich nepřesahuje 1 g/l, a pufrující složku v koncentraci 1 až 3 g/l, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje masový extrakt v koncentraci 2 až 15 g/l, zdroj síry a biogenních kovů tvořený směsí  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  a  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  v celkové koncentraci 0,025 až 0,25 g/l nebo směsí  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  a  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  v celkové koncentraci 0,005 až 0,02 g/l, a izo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo jejich redukované hydrogenované deriváty v koncentraci 10 až 80 mg/l.
- 10 2. Kultivační půda podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje izo- $\alpha$ -kyseliny a/nebo jejich redukované hydrogenované deriváty v koncentraci 50 mg/l.
- 15 3. Kultivační půda podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje 0,05 až 0,3 % hmotnostních agarů.
- 20 4. Kultivační půda podle libovolného z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že jako redukované hydrogenované deriváty izo- $\alpha$ -kyselin obsahuje tetrahydroizo- $\alpha$ -kyseliny.
- 25 5. Kultivační půda podle libovolného z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že jako redukované hydrogenované deriváty izo- $\alpha$ -kyselin obsahuje dihydroizo- $\alpha$ -kyseliny.
- 30 6. Kultivační půda podle libovolného z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že jako redukované hydrogenované deriváty izo- $\alpha$ -kyselin obsahuje hexahydroizo- $\alpha$ -kyseliny.
- 35 7. Způsob odběru stěrů odběrovými tyčinkami s odběrovou částí, **vyznačující se tím**, že před provedením stěru je odběrová část odběrové tyčinky namočená v roztoku sterilované destilované vody s přídavkem látky snižující redoxpotenciál v koncentraci 0,25 až 3 g/l, a po provedení stěru se odebraný stěr umístí do kultivační půdy podle libovolného z nároků 1 až 6.
- 40 8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že složkou snižující redoxpotenciál je látka ze skupiny cystein hydrochlorid, thioglykolát sodný, kyselina askorbová v koncentraci 0,25 až 1 g/l, nebo směs alespoň dvou těchto látek, přičemž koncentrace žádné z nich nepřesahuje hodnotu 1 g/l.

2 výkresy



Obr. 1



**Obr. 2**

---

Konec dokumentu

---