

9. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1976): Organoleptička kvaliteta jugoslavenskih sireva — prilog poznavanju kvalitete i problematike standardizacije naših mlječnih proizvoda. Ref., IV Jugosl. stočarska konferencija Mostar 76. Radovi Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, god. XXIV, br. 27, str. 699—702. **Mljekarstvo**, Zagreb, 7/1976, str. 152—155, sl. 1, lit. 8.
10. SABADOŠ D., RAJŠIĆ B. (1976): Organoleptička kvaliteta jugoslavenskih maslaca — prilog poznavanju kvalitete i problematike standardizacije naših mlječnih proizvoda. Ref., IV Jugosl. stočarska konferencija Mostar 76. Radovi Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, god. XXIV, br. 27, str. 693—697. **Mljekartsvo**, Zagreb, 8/1976, 172—175, sl. 1, lit. 8.

## PRIMENA »API« MIKROMETODE ZA IDENTIFIKACIJU BAKTERIJA RODA LACTOBACILLUS

Dr Stojanka MITIĆ

Institut za mlekarstvo, mikrobiološko odjeljenje, Beograd

Laktobacili su veoma rasprostranjene bakterije u prirodi, pa je veliki broj autora bio zainteresovan za njihovu klasifikaciju. Od literaturnih podataka citiramo Orla Jensa (1919, 1942) koji je prvi dao klasifikaciju laktobacila, još uvijek aktuelnu, prema sledećim kriterijumima: prirodi kiseline, temperaturi rasta, procentu i rotatornoj moći mlečne kiseline, potrebi azotnih materija i fermentaciji niza ugljenih hidrata.

Rogosa & Sharpe (1959) predložili su klasifikaciju koja je i danas najviše u primeni. Ovi autori su zadržali terminologiju i deobu roda u tri podroda: dva fermentativna *Thermobacterium* i *Streptobacterium*, i jedan heterofermentativan — *Betabacterium*. Savremena klasifikacija po hemijskom sastavu ćelijskog zida, uz primenu precizne metodike, pruža mogućnost diferencijacije vrsta, a ponekad i sojeva laktobacila (Cheseman, 1959). Na osnovu razlike mureina ćelijskog zida Kandler (1970) daje klasifikaciju homogenih grupa. Sharpe (1970) ističe da imunološki rezultati serološke identifikacije vrsta prema grupama: A, B, C, D, E, F, i G nisu u kontradikciji sa fiziološkim biohemijskim testovima aktuelne klasifikacije. Rogosa et al. i Franklin & Sharpe (1964) kompletirali su klasifikaciju u odnosu na potrebe laktobacila u vitaminima: tiamin, riboflavin, pirodoksal, foina kiselina, vitamin — B<sub>12</sub> i tiamidin.

Novija istraživanja genotipa bakterija ukazuju na mogućnost klasifikacije vrsta laktobacila na osnovu genetskog sadržaja DNA i genetske homologije DNA i RNA. Ova metodika je vrlo delikatna, a primenili su je Gasser & Sebald. Prema sadržaju DNA laktobacili su podeljeni u tri grupe. Potkomitet za taksonomiju sojeva roda *Lactobacillus* (1968) iznosi da još uvek traje faza eksperimentalnog proveravanja različitih metoda koje bi se primenile za određivanje iste karakteristike i komparativnog rada, sa klasičnim metodama.

Uzimajući u obzir dosadašnje rezultate identifikacije laktobacila smatrali smo za potrebno da na osnovu naših eksperimenata komparativnog istraživanja klasične dijagnostike i API mikrometode dođemo do saznanja koje će nam omogućiti objektivno zaključivanje u pogledu primene API mikrometode za brzu identifikaciju laktobacila.

Tim pre, što se svi citirani autori slažu da je identifikacija laktobacila vrlo teška, pa su potrebna nova proveravanja sa klasičnim metodama i uvođenje novih metoda.

### Materijal i metode

API (Vixotab; La Balme-les grottes; Francuska) sistem *Lactobacillus* predstavlja niz od 50 plastičnih epruvetica, koje sadrže, podloge u liofilizovanom stanju, sa određenim reaktivima za svaku istraživanu karakteristiku. Daju mogućnost interpretacije i porasta 39 glicida, stvaranje CO<sub>2</sub>, dokazivanje dihidrolaze arginina, dokazivanje inhibicije u prisustvu 0,4 i 0,6% teepola, 4,6, i 10% NaCl, dokazivanje beta-galaktozidaze, redukcije nitrata u nitrite i stvaranja acetilmetilkarbinola.

Za komparativna istraživanja služili su nam sojevi iz naše kolekcije i to sledećih vrsta. *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. jugurti*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. delbrückii* i *L. leichmanii*. Za klasičnu dijagnostiku korišćeni su biohemijski testovi koji se primenjuju u Pasterovom institutu u Lilu (Francuska).

Kulture sojeva su uzastopno tri puta presejavane u MRS bujon, što su ga opisali Man, Rogosa & Sharpe (1960). Pasažirane su u eksponencijalnoj fazi rasta. Posljednje subkultivisanje se vrši direktno u kivete za centrifugiranje. Posljednja se kultura centrifugira i ispere sa fiziološkom otopinom NaCl, a centrifugat se prenosi u MRS bujon za identifikaciju (bez glukoze i mesnog ekstrakta). Pripremanje optičke gustine ćelija izvodi se prema skali po McFarlandu, a gustina suspenzija ćelija se podešava prema testnim epruvetama 2 i 5.

Inokulacija epruvetica se vrši Pasterovom pipetom ili tankom pipetom sa dovoljnom količinom suspenzije ćelija laktobacila.

Radi porasta kulture pod anaerobnim uslovima dodaje se u otvore sterilno parafinsko ulje, galerija poklopi i inkubira na 37°C. Brzine pojava biohemijskih promena se registruju posle 3,24 i 48 časova upisivanjem u odgovarajuće kolone profila. Reaktivni za nitrate i za acetoin se dodaju kod poslednjeg čitanja da ne bi pare kiselina modifikovale druge reakcije.

Interpretacija rezultata identifikacije sojeva vrši se prema profilima karakterističnim za vrste laktobacila koje pripadaju podrodovima: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* i *Bacterium*.

Za klasičnu identifikaciju sojeva primenjena je šema Rogosa & Sharpe (1959).

### Rezultati i diskusija

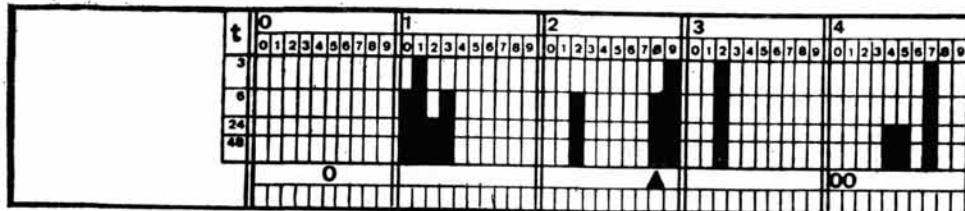
Rezultati komparacije biohemijskih testova za identifikaciju laktobacila sa odgovarajućim testovima API sistema, pokazali su da među njima postoji velika podudarnost. Slaganje je konstatovano kod svih testova, izuzev kod dokazivanja rezistencije prema određenim koncentracijama NaCl. Ovo neslaganje je uočio i Paule (1971), pa su naša zapažanja u skladu s ovim konstatacijama.

Literaturni podaci ukazuju na moguća odstupanja kod izvođenja API mikrometode. Prema našem iskustvu podešavanje koncentracije bakterija je veo-

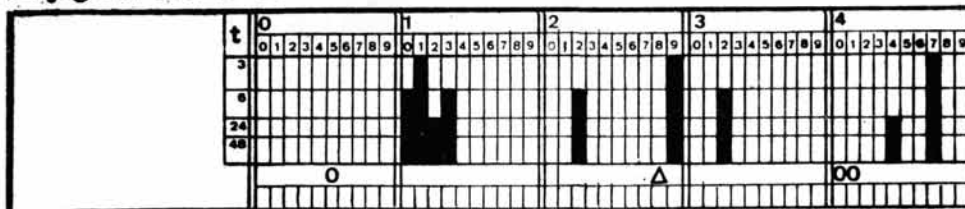
# THERMOBACTERIUM

(Profil 1)

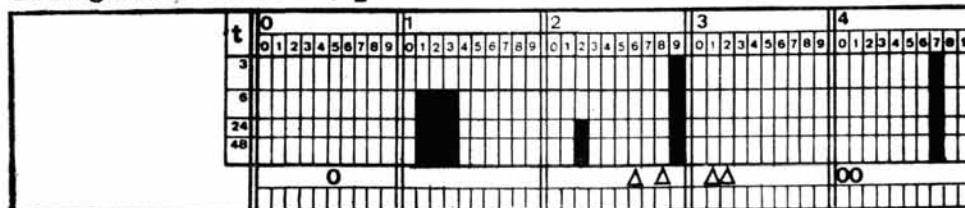
**L. helveticus** PMT ou CNRZ 384



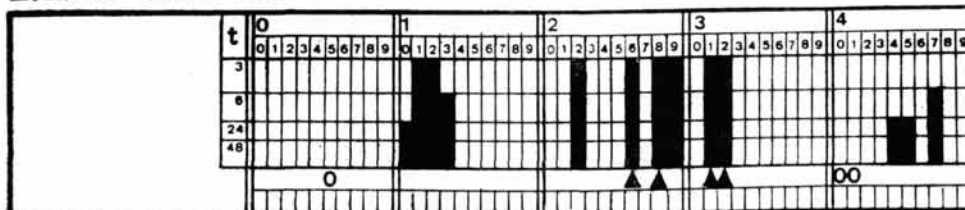
**L. jugurti** NCDO 99



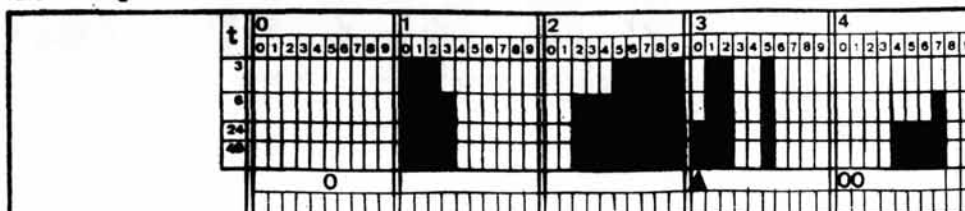
**L. bulgaricus** NCDO LY<sub>2</sub>



**L. lactis** CNRZ 252



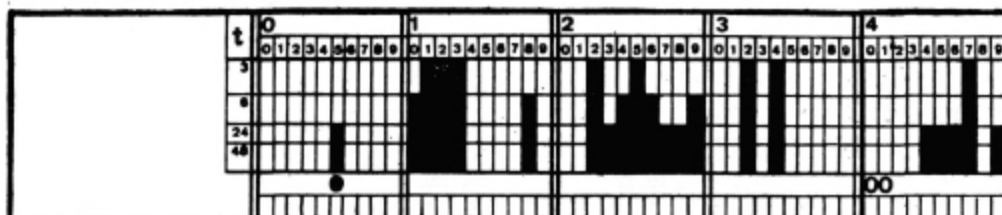
**L. acidophilus** CNRZ 216



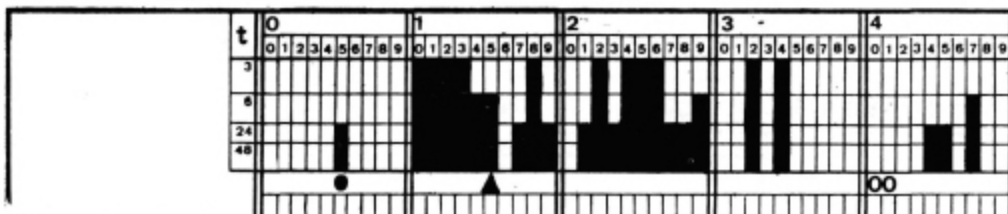
# STREPTOBACTERIUM

(Profil 2)

## *L. casei casei* ATCC 393



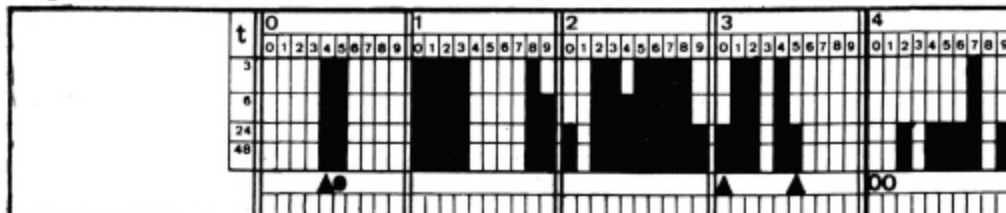
## *L. casei rhamnosus* ATCC 7469



## *L. casei alactosus* CNRZ 315



## *L. plantarum* ATCC 14917



ma bitno, kako za fermentacije glicida, tako i za određivanje rezistentnosti prema koncentraciji teepola i NaCl. Ako je koncentracija bila jače izražena, nego je to precizira metodom, reakcije su bile pozitivnije. Međutim, kod ponovljenih oglada uklanjanjem ovih mogućih tehničkih grešaka rezultati čitanja su poboljšani.

Prednosti API mikrometode su daleko nadmašile ove male nepogodnosti, jer 49 karakteristika, istraživanih u isto vreme, sa istom suspenzijom ćelija daju preciznije rezultate u dijagnostici bakterija.

### Zaključak

Na osnovu analiza eksperimentalnih podataka komparativnog istraživanja klasične identifikacije nekih sojeva vrsta *Lactobacillus* i API mikrometode konstatovano je:

-- da API mikrometoda daje pouzdane rezultate kao i klasična metoda identifikacije bakterijskih kultura vrsta *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. jugurti*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. delbrückii* i *L. leichmanii*;

-- da je zbog lake tehnike rada, brzine čitanja rezultata i preciznosti identifikacije sojeva API mikrometoda pogodnija od klasične metode.

### Literatura

Franklin, J. G. & Sharpe, Elisabeth (1964): Physiological characteristics and vitamin requirements of Lactobacilli isolated from milk and cheese. **J. gen. Microbiol.** 34, 143—151.

Gasser & Sebal, M. (1966): Composition en bases nucleiques des bacteries du genre Lactobacillus. **Ann. Inst. Pasteur** 110, 261—275.

Kandler, O. (1970): Aminoacid sequence of the murein and taxonomy of the genera Lactobacillus, Bifidobacterium, Leuconostoc and Pedicoccus. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 20, 491—507.

De Man, J. C. Rogosa, M. & Sharpe, M. E. (1960): A medium for the cultivation of Lactobacilli. **J. appl. Bact.** 23, 130—135.

Orla — Jensen, S.: The lactic acid bacteria. Andr. Fred. Host and Son, Copenhagen, 1919.

Orla — Jensen, S.: The lactic acid bacteria. Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1942.

Paule, R. (1971): Contribution à l'étude biochimique du genre Lactobacillus par une methode normalisée.

Rogosa, M., Franklin J. G. & Perry, K. D. (1961): Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of Lactobacillus spp. **J. gen. Microbiol.** 25, 473—482.

Sharpe, M. E. (1970): Cell wall and cell membrane antigens in the classification of lactobacilli. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 20, 509—518.