

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 973

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-191**
(22) Přihlášeno: **27.03.2014**
(40) Zveřejněno: **07.10.2015**
(Věstník č. 40/2015)
(47) Uděleno: **15.08.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **25.09.2019**
(Věstník č. 39/2019)

(56) Relevantní dokumenty:

Schleifer KH et al. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 1990, 40(1), 19-27.; GenBank, ac. no. HE582765, 12.10.2011; Iijima K et al. Modified multiplex PCR methods for comprehensive detection of *Pectinatus* and beer-spoilage cocci. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(10), 2764-6.; Felsberg J et al. Development of a species-specific PCR assay for identification of the strictly anaerobic bacterium *Selenomonas lacticifex* found in biofilm-covered surfaces in brewery bottling halls. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(5), 1328-35.
WO 97/20071.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha
2, CZ
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4 -
Krč, CZ

(72) Původce:

Dr. Jürgen Felsberg, CSc., Jilové u Prahy, CZ
Ing. Markéta Jelínková, Ph.D., Praha 4, CZ
RNDr. Dagmar Matoulková, Ph.D., Trutnov 1, CZ

(74) Zástupce:

Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář,
Zábrdovická 11, 615 00 Brno

(54) Název vynálezu:

**Způsob detekce bakterií druhu
*Selenomonas lacticifex***

(57) Anotace:

Způsob detekce bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*, při kterém se používá pár tvořený oligonukleotidem SelenoFor2 tvořeného sekvencí 5'-CGG-GGA-CGA-ATG-TGC-AGT-ATT-T-3', a oligonukleotid SelenoRev1 tvořený sekvencí 5'-GGC-TTC-GCT-GCT-CTC-TGT-CCA-3', nebo oligonukleotid SelenoRev2 tvořený sekvencí 5'-GGT-TTA-TGG-GGT-TCG-CTT-GG-3'. Směs se vloží do termocykleru, kde nejprve po dobu 60 až 300 s dochází k počáteční denaturaci při teplotě 94 až 98 °C a následně probíhá 30 až 40 amplifikačních cyklů, z nichž každý obsahuje fázi denaturace, která probíhá po dobu 20 až 30 s při teplotě 94 až 98 °C, fázi nasedání oligonukleotidů, která probíhá po dobu 20 až 30 s při teplotě 66 až 69 °C a fázi extenze, která probíhá po dobu 30 až 90 s při teplotě 72 °C, načež následuje konečná extenze, která probíhá po dobu 300 s při teplotě 70 až 80 °C a ukončovací fáze, která probíhá při teplotě 4 °C.

CZ 307973 B6

Způsob detekce bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu detekce bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*.

Dosavadní stav techniky

10

Selenomonas je rod striktně anaerobních, gramnegativních, tyčinkovitých, pohyblivých, mezofilních, fermentujících, nesporulujících bakterií, které se běžně vyskytují např. v ústní dutině člověka, v bachoru býložravců, ve střevech prasat a některých hlodavců, apod. Do tohoto rodu je v současné době zařazeno 11 druhů bakterií, přičemž minimálně jeden z nich – konkrétně

15 *Selenomonas lacticifex* byl izolován také ve spojitosti s kontaminací pivovarských kvasnic, resp. pivovarského zařízení. Tento druh bakterií má přitom schopnost tzv. „kazit“ pivo, neboť během svého životního cyklu produkuje řadu chemických sloučenin, jako např. kyselinu mléčnou, octovou, propionovou, apod., které negativně ovlivňují organoleptické i vizuální vlastnosti piva, když zvyšují jeho kyselost, a způsobují charakteristický masivní zákal a nepříjemný zápach.

20

Přítomnost bakterií druhu *Selenomonas lacticifex* v pivovarských kvasnicích a/nebo pivu a/nebo v pivovarském provozu a/nebo pivovarském zařízení je však jen velmi těžko zjištělná, neboť vzhledem ke specifickým růstovým požadavkům bakterií tohoto druhu nelze pro jejich identifikaci použít konvenční membránovou filtraci, a v současné době neexistuje pro detekci

25 těchto bakterií ani žádná selektivní půda. Z těchto důvodů např. ani Evropská pivovarská konvence nezahrnuje identifikaci rodu bakterií *Selenomonas* ve svých doporučených mikrobiologických metodách (viz např. Analytica EBC, 2013).

30

V článku Juvonen et al.: “Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia” Int. J. Food Microbiol. 125: 162–169, 2008, byly sice popsány metody skupinové identifikace anaerobních bakterií rodů *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* a *Zymophilus*, které spočívají v provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím univerzálních oligonukleotidových sekvencí, avšak jejich nevýhodou je nutnost pro identifikaci konkrétních rodů bakterií následně

35 štěpit produkt této reakce specifickým restrikním enzymem (tzv. PCR-RFLP metoda), díky čemuž dochází nejen k prodloužení doby nutné pro detekci, ale také k navýšení finančních nákladů a zvýšení pravděpodobnosti křížové kontaminace vzorků nebo chyby laboranta.

40

Ve stejném článku byla dále popsána také metoda, která spočívá v použití tzv. Real-time PCR (kvantitativní polymerázové řetězové reakce) a následném odlišení jednotlivých rodů bakterií obsažených ve vzorku na základě analýzy křivky teploty tání DNA. Nevýhodou této metody je však nejen vysoká pořizovací cena přístrojového vybavení a spotřebního materiálu, ale také požadavek na zaškolenou a zkušenou obsluhu tohoto vybavení, díky čemuž není tento způsob prakticky použitelný v běžném pivovarském provozu.

45

V článku Vávrová et al.: „MALDI-TOF MS Analysis of Anaerobic Bacteria Isolated from Biofilm-Covered Surfaces in Brewery Bottling Halls“ J. Am. Soc. Brew. Chem., 2014 (v tisku), pak bylo pro identifikaci bakterií tohoto druhu navrženo použití hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací s průletovým analyzátozem (Matrix Assisted Laser

50 Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, ve zkratce MALDI-TOF MS), avšak nevýhodou tohoto způsobu je také nejen vysoká pořizovací cena potřebného přístrojového vybavení, ale také požadavek na jeho zaškolenou a zkušenou obsluhu, díky čemuž není tento způsob prakticky použitelný v běžném pivovarském provozu.

Cílem vynálezu je způsob detekce bakterií tohoto druhu, který by byl použitelný v běžném pivovarském provozu, případně v servisní laboratoři využívané pivovarem, bez nutnosti pořízování speciálního laboratorního vybavení, používání nákladného spotřebního materiálu a zaškolování obsluhy.

5

Podstata vynálezu

Cíle vynálezu se dosáhne způsobem detekce bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*, jehož podstata spočívá v polymerázové řetězové reakci (PCR), při které se použije DNA alespoň jednoho druhu bakterií obsažených v daném vzorku, např. piva a/nebo vzorku odebraném v pivovarském provozu a/nebo zařízení, a pár oligonukleotidů (primerů) komplementárních k části sekvence 16S rDNA bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*, a to konkrétně oligonukleotid SelenoFor2 a oligonukleotid SelenoRev1, nebo oligonukleotid SelenoRev2. Oligonukleotidy SelenoFor2, SelenoRev1 a SelenoRev2 jsou uvedeny v tabulce 1.

15

Tabulka 1

Označení	Oligonukleotidová sekvence
SelenoFor2	5'-CGG-GGA-CGA-ATG-TGC-AGT-ATT-T-3'
SelenoRev1	5'-GGC-TTC-GCT-GCT-CTC-TGT-CCA-3'
SelenoRev2	5'-GGT-TTA-TGG-GGT-TCG-CTT-GG-3'

Při určování těchto oligonukleotidů se izolovala chromozomální DNA kmenů bakterií nejčastěji kontaminujících pivo – konkrétně kmenů *Selenomonas lacticifex* DSM 20757, *Megasphaera paucivorans* DSM 16981, *Pectinatus brassicae* DSM 24661, *Pectinatus haikarae* DSM 16980, *Zymophilus paucivorans* DSM 20756 a *Zymophilus raffinivorans* DSM 20765, přičemž prostřednictvím univerzálních oligonukleotidů se amplifikovaly a osekvenovaly geny kódující 16S rRNA. Takto získané oligonukleotidy všech uvedených kmenů bakterií se vzájemně srovnaly, na základě čehož se zjistilo, že páry výše uvedených oligonukleotidů, jsou specifické pouze právě pro druh *Selenomonas lacticifex*.

25

Způsob detekce bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*, podle vynálezu pak spočívá v tom, že se do reakční směsi, která obsahuje DNA-polymerázu, nukleotidy (deoxyribonukleosidtrifosfáty: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a Mg^{2+} ionty, přidá pár synteticky připravených oligonukleotidů obsahující oligonukleotid SelenoFor2 a oligonukleotid SelenoRev1 nebo SelenoRev2, a DNA izolovaná z alespoň jednoho druhu bakterií obsažených ve vzorku, častěji však směsná DNA izolovaná z více druhů bakterií obsažených v tomto vzorku. Tato směs se poté uloží do termocykleru, ve kterém proběhne sekvence rychlých změn teploty a polymerázová řetězová reakce. Během řady experimentů se přitom zjistilo, že klíčová teplota fáze nasedání oligonukleotidů během polymerázové řetězové reakce je pro všechny výše uvedené varianty párů oligonukleotidů 66 až 69 °C.

30

35

Po ukončení polymerázové řetězové reakce (pokud tato reakce vůbec proběhne) se ověří přítomnost reakčního produktu, a pokud je přítomen, separuje se tento produkt z reakční směsi např. gelovou elektroforézou s velikostními standardy, následně se obarví interkalačním barvivem, (např. ethidium bromidem), vizualizuje UV zářením a srovnáním s velikostními standardy, které se separují souběžně s ním, se určí jeho charakteristická délka. Podle této charakteristické délky se následně detekuje DNA bakterií druhu *Selenomonas lacticifex* v daném vzorku DNA, a tím přítomnost bakterií tohoto druhu v daném vzorku, resp. prostředí, ze kterého byl vzorek odebrán. Charakteristická délka produktu polymerázové řetězové reakce v přítomnosti DNA bakterií tohoto rodu je přitom při použití páru oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev1 824 bp a při použití páru oligonukleotidů SelenoFor2 a oligonukleotidu SelenoRev2 850 bp.

45

50

V případě použití zařízení pro tzv. Real Time PCR, tj. kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci, u kterého je možné sledovat narůstající množství produktu již v průběhu polymerázové řetězové reakce, není třeba tento produkt po ukončení polymerázové řetězové reakce separovat a určovat jeho charakteristickou velikost dodatečně.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1 – Použití oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev1

Do reakční směsi, která obsahovala DNA-polymerázu, nukleotidy a Mg^{2+} ionty (konkrétně se použila směs PCR Master-mix, výrobce Top-Bio, s.r.o.) se přidaly synteticky připravené oligonukleotidy SelenoFor2 a SelenoRev1 a DNA izolovaná z bakterií kmene *Selenomonas lacticifex* DSM 20757. Výsledný objem reakční směsi, byl 50 μ l, přičemž oligonukleotidy SelenoFor2, SelenoRev1 a DNA bakterií se dodaly v pufru, v množství dle tabulky 2.

Tabulka 2

Složka reakční směsi	Množství
PCR Master Mix	25 μ l
SelenoFor2 (10 μ M v pufru)	2 μ l
SelenoRev1 (10 μ M v pufru)	2 μ l
DNA	50 až 100 ng v pufru
H ₂ O	doplněno do 50 μ l

Polymerázová řetězová reakce pak proběhla v termocykleru (konkrétně TGradient, spol. Biometra, Německo) přičemž nejprve po dobu 60 s probíhala počáteční denaturace při teplotě 94 °C, poté proběhlo 35 amplifikačních cyklů, z nichž byl každý složen z fáze denaturace (94 °C, 30 s), nasedání oligonukleotidů (68 °C, 20 s) a extenze (72 °C, 90 s), poté následovala konečná extenze, která probíhala po dobu 300 s při teplotě 72 °C, načež byla polymerázová řetězová reakce ukončena za teploty 4 °C.

V průběhu polymerázové řetězové reakce se namnožil příslušný úsek DNA bakterií kmene *Selenomonas lacticifex* DSM 20757 ohraničený použitým párem oligonukleotidů, v daném případě tedy SelenoFor2 a SelenoRev1. Vytvořený produkt, který se následně z reakční směsi izoloval gelovou elektroforézou s velikostními standardy, se obarvil ethidium bromidem a vizualizoval UV zářením; jeho charakteristická délka byla 824 bp.

Příklad 2

Způsob podle vynálezu s využitím oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev1 se dále ověřil na sbírkových kmenech *Selenomonas lacticifex* VTT E-86269 a *Selenomonas lacticifex* VTT E-86273, přičemž se použili stejné materiály a stejné podmínky polymerázové řetězové reakce jako v příkladu 1. Charakteristická délka produktu této reakce pak byla 824 bp. Z toho vyplývá, že použité oligonukleotidy SelenoFor2 a SelenoRev1 jsou specifické pro druh *Selenomonas lacticifex*.

Příklad 3

Způsob podle vynálezu s využitím oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev1 se dále testoval na pěti kmenech bakterií čeledi *Veillonellaceae* příbuzných s druhem *Selenomonas lacticifex*, u nichž se oprávněně předpokládala podobná sekvence v 16S rDNA, a to *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20467, *Pectinatus frisingensis* DSM 20465 a RIBM 2-86, *Megasphaera cerevisiae* DSM

20461 a DSM 20462. Při použití izolované DNA těchto kmenů bakterií a stejných materiálů a podmínek jako v příkladu 1, však polymerázová řetězová reakce neproběhla, což potvrzuje předpoklad, že použité oligonukleotidy SelenoFor2 a SelenoRev1 jsou specifické pouze pro druh *Selenomonas lacticifex*, a při jejich použití v souvislosti s jinými mikroorganismy nedochází k polymerázové řetězové reakci.

Příklad 4

Způsob podle vynálezu s využitím oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev1 se dále testoval na souboru vzorků odebraných z pivovarského provozu, u kterých byly při mikroskopickém pozorování objeveny mj. typické prohnuté tyčinkové (měsíčkovité) bakterie, o kterých se předpokládalo, že se jedná o bakterie druhu *Selenomonas lacticifex*. Charakteristická velikost produktu polymerázové řetězové reakce, která proběhla za použití stejných materiálů a podmínek jako v příkladu 1, přitom byla 824 bp.

Pro ověření se dále oligonukleotidové sekvence produktu polymerázové řetězové reakce sekvenovaly a srovnaly se sekvencí 16S rDNA bakterií kmene *Selenomonas lacticifex* DSM 20757, přičemž se zjistila jejich 100% homologie, která potvrdila, že dané bakterie jsou bakterie druhu *Selenomonas lacticifex*, a současně i specifitu použitých oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev1 pro tyto bakterie.

Příklad 5 – Použití oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev2

Do reakční směsi, která obsahovala DNA-polymerázu, nukleotidy a Mg^{2+} ionty (konkrétně se použila směs PCR Master-mix, výrobce Top-Bio, s.r.o.) se přidaly synteticky připravené oligonukleotidy SelenoFor2 a SelenoRev2 a DNA izolovaná z bakterií kmene *Selenomonas lacticifex* DSM 20757. Výsledný objem reakční směsi byl 50 μ l, přičemž oligonukleotidy SelenoFor2, SelenoRev2 a DNA bakterií se dodaly v pufru, v množství dle tabulky 3.

Tabulka 3

Složka reakční směsi	Množství
PCR Master Mix	25 μ l
SelenoFor2 (10 μ M v pufru)	2 μ l
SelenoRev2 (10 μ M v pufru)	2 μ l
DNA	50 až 100 ng v pufru
H ₂ O	doplněno do 50 μ l

Polymerázová řetězová reakce probíhala ve stejném termocykleru a za podmínek stejných jako v příkladu 1. V jejím průběhu se namnožil příslušný úsek DNA bakterií kmene *Selenomonas lacticifex* DSM 20757 ohraničený použitým párem oligonukleotidů, v daném případě tedy SelenoFor2 a SelenoRev2. Vytvořený produkt, který se následně z reakční směsi izoloval gelovou elektroforézou s velikostními standardy, se obarvil ethidium bromidem a vizualizoval UV zářením; jeho charakteristická délka byla 850 bp.

Příklad 6

Způsob podle vynálezu s využitím oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev2 se dále ověřil na sbírkových kmenech *Selenomonas lacticifex* VTT E-86269 a *Selenomonas lacticifex* VTT E-86273, přičemž se použily stejné materiály a stejné podmínky polymerázové řetězové reakce jako v příkladu 5. Charakteristická délka produktu této reakce pak byla 850 bp. Z toho vyplývá, že použité oligonukleotidy SelenoFor2 a SelenoRev2 jsou specifické pro druh *Selenomonas lacticifex*.

Příklad 7

Způsob podle vynálezu s využitím oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev2 se dále testoval na pěti kmenech bakterií čeledi *Veillonellaceae* příbuzných s druhem *Selenomonas lacticifex*, u nichž se oprávněně předpokládala podobná sekvence v 16S rDNA, a to *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20467, *Pectinatus frisingensis* DSM 20465 a RIBM 2-86, *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 a DSM 20462. Při použití izolované DNA těchto kmenů bakterií a stejných materiálů a podmínek jako v příkladu 5, však polymerázová řetězová reakce neproběhla, což potvrzuje předpoklad, že použité oligonukleotidy SelenoFor2 a SelenoRev2 jsou specifické pouze pro druh *Selenomonas lacticifex*, a při jejich použití v souvislosti s jinými mikroorganismy nedochází k polymerázové řetězové reakci.

Příklad 8

Způsob podle vynálezu s využitím oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev2 dále také testoval na souboru vzorků odebraných z pivovarského provozu, u kterých byly při mikroskopickém pozorování objeveny mj. tyčinkovité prohnuté (měsíčkovité) bakterie, u kterých se předpokládalo, že se jedná o bakterie druhu *Selenomonas lacticifex*. Charakteristická velikost produktu polymerázové řetězové reakce, která proběhla za použití stejných materiálů a podmínek jako v příkladu 5, přitom byla 850 bp.

Pro ověření se dále oligonukleotidové sekvence produktu polymerázové řetězové reakce sekvenovaly a srovnaly se sekvencí 16S rDNA bakterií kmene *Selenomonas lacticifex* DSM 20757, přičemž se zjistila jejich 100% homologie, která potvrdila, že dané bakterie jsou bakterie druhu *Selenomonas lacticifex*, a současně i specifitu použitých oligonukleotidů SelenoFor2 a SelenoRev2 pro tyto bakterie.

V dalších experimentech se se stejnými výsledky použily libovolné páry obsahující oligonukleotidy SelenoFor2, nebo jiný oligonukleotid, který měl s oligonukleotidem SelenoFor2 alespoň 95% homologii, a oligonukleotid SelenoRev1, nebo jiný oligonukleotid, který měl s oligonukleotidem SelenoRev1 alespoň 95% homologii, nebo oligonukleotid SelenoRev2, nebo jiný oligonukleotid, který měl s oligonukleotidem SelenoRev2 alespoň 95% homologii.

Způsob a oligonukleotidy podle vynálezu se dále testovaly také za jiných podmínek průběhu jednotlivých kroků polymerázové řetězové reakce. Přitom se zjistilo, že pro úspěšný průběh této reakce může probíhat počáteční denaturace po dobu 60 až 300 s při teplotě 94 až 98 °C, následné amplifikační cykly (30 až 40) musí obsahovat fázi denaturace, která může probíhat po dobu 20 až 30 s při teplotě 94 až 98 °C, fázi nasedání oligonukleotidů, která musí probíhat po dobu 20 až 30 s při teplotě 66 až 69 °C a fázi extenze, která může probíhat po dobu 30 až 90 s při teplotě 72 °C, následná konečná extenze pak může probíhat po dobu 300 s při teplotě 70 až 80 °C, načež při teplotě 4 °C probíhá ukončovací fáze této reakce.

Minimální požadavek na složení reakční směsi je přitom ve všech variantách 1 až 1,5 u termostabilní DNA-polymerázy, 0,2 mM každého z nukleotidů (deoxyribonukleosidtrifosfáty: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 1,5 mM množství Mg^{2+} iontů ve formě $MgCl_2$, přičemž s výhodou se použije již průmyslově připravená směs, např. směs PCR Master-mix, výrobce Top-Bio, s r.o. Koncentrace oligonukleotidů je doporučována v rozmezí 0,2 až 1 μM , avšak dle provedených experimentů postačuje i jen 0,1 μM .

Minimální doporučené množství DNA bakterií v reakční směsi je pak pro dosažení spolehlivého výsledku 20 až 100 ng.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob detekce bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*, **vyznačující se tím**, že ze vzorku obsahujícího alespoň jeden druh bakterií se izoluje DNA těchto bakterií, která se v množství alespoň 20 ng v pufru přidá do reakční směsi, která obsahuje alespoň 1 u termostabilní DNA-polymerázy, alespoň 0,2 mM každého z nukleotidů dATP, dCTP, dGTP, dTTP a alespoň 1,5 mM
- 10 Mg^{2+} iontů, přičemž předtím a/nebo souběžně se do této směsi přidá pár oligonukleotidů tvořený alespoň 0,1 μM oligonukleotidu SelenoFor2 tvořeného sekvencí 5'-CGG-GGA-CGA-ATG-TGC-AGT-ATT-T-3' a alespoň 0,1 μM oligonukleotidu SelenoRev1 tvořeného sekvencí 5'-GGC-TTC-GCT-GCT-CTC-TGT-CCA-3' nebo oligonukleotidu SelenoRev2 tvořeného sekvencí 5'-GGT-TTA-TGG-GGT-TCG-CTT-GG-3', přičemž se tato směs vloží do termocykleru, kde
- 15 nejprve po dobu 60 až 300 s dochází k její počáteční denaturaci při teplotě 94 až 98 °C a následně probíhá 30 až 40 amplifikačních cyklů, z nichž každý obsahuje fázi denaturace, která probíhá po dobu 20 až 30 s při teplotě 94 až 98 °C, fázi nasedání oligonukleotidů, která probíhá po dobu 20 až 30 s při teplotě 66 až 69 °C a fázi extenze, která probíhá po dobu 30 až 90 s při teplotě 72 °C, načež následuje konečná extenze, která probíhá po dobu 300 s při teplotě 70 až 80 °C a
- 20 ukončovací fáze, která probíhá při teplotě 4 °C, přičemž a/nebo po čemž se sleduje zda mezi párem oligonukleotidů a DNA daného kmene bakterií probíhá/proběhla polymerázová řetězová reakce, a pokud tato reakce probíhá/proběhla, určuje se během jejího průběhu nebo po jejím ukončení charakteristická délka jejího produktu, z níž se usuzuje na to, zda zkoumaná DNA patří nebo obsahuje podíl DNA bakterií druhu *Selenomonas lacticifex* nebo ne, a zda tedy zkoumaný
- 25 vzorek obsahuje bakterie tohoto rodu nebo ne.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zkoumaná DNA patří nebo obsahuje podíl DNA bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*, pokud při použití páru oligonukleotidů SelenoFor2 tvořeného sekvencí 5'-CGG-GGA-CGA-ATG-TGC-AGT-ATT-T-3' a oligonukleotidu
- 30 SelenoRev1 tvořeného sekvencí 5'-GGC-TTC-GCT-GCT-CTC-TGT-CCA-3' má produkt polymerázové řetězové reakce charakteristickou délku 824 bp.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zkoumaná DNA patří nebo obsahuje podíl DNA bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*, pokud při použití páru oligonukleotidů SelenoFor 2 tvořeného sekvencí 5'-CGG-GGA-CGA-ATG-TGC-AGT-ATT-T-3' a oligonukleotidu
- 35 SelenoRev2 tvořeného sekvencí 5'-GGT-TTA-TGG-GGT-TCG-CTT-GG-3' má produkt polymerázové řetězové reakce charakteristickou délku 850 bp.