



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

219353
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/00

(22) Přihlášeno 25 03 81
(21) (PV 2168-81)

(40) Zveřejněno 28 03 82

(45) Vydáno 15 08 85

(75)

Autor vynálezu

WASSERBAUER RICHARD ing. CSc., PRAHA, ŠTIFTER MARTIN ing. CSc.,
KRALUPY nad Vltavou, ROHLÍK ZDENĚK dipl. tech., PRAHA, ROUBALOVÁ
JANA, PRAHA, VANČUROVÁ DRAHOMÍRA RNDr., PRAHA

(54) **Selektivní kultivační půda pro mikroorganismy schopné růstu na
plastech na bázi polyolefinů**

1

Dosud používané metody kultivace neumožňují pěstovat mikroorganismy na resistantních plastech ani vyhledávat kmeny schopné adaptace na těchto obtížně likvidovatelných polymerech. Proto byla navržena podle vynálezu selektivní kultivační půda o složení (v hmotnostních procentech): 0,2 % KH_2PO_4 , 0,2 % K_2HPO_4 , 0,03 % MgSO_4 , 0,02 % peptonu, 0,025 % trifenylnitrazoliumchloridu, 2,5 % agaru a 1 objemového procenta směsi polyethylen — minerální, nejlépe neinhibovaný transformátorový olej, který obsahuje 5 až 10 hmotnostních procent polyethylenů.

Způsob přípravy selektivní kultivační půdy je vyznačený tím, že k 0,5 až 1 g polyethylenové fólie libovolné tloušťky se přidá 10 ml transformátorového oleje, směs se zahřívá, nejlépe v autoklávu po dobu 15 až 30 minut na teplotu 120 °C a po rozpuštění plastů v oleji se roztok za horka přidá do základního média 80 až 100 °C teplého, obsahujícího KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 a pepton, mixuje v mixéru 2 až 5 minut rychlostí 6 až 12 000 ot. min⁻¹, po přidání agaru sterilizuje v autoklávu 20 minut při teplotě 120 °C a těsně před litím do Petriho misek se v 5 ml destilované vody přidá trifenylnitrazoliumchlorid, sterilizovaný paralelně s kultivační půdou.

2

Vynález se týká selektivní kultivační půdy pro izolaci mikroorganismů schopných adaptace a růstu na plastech na bázi polyolefinů.

Dosud používaná izolace mikroorganismů aktivních vůči různým chemickým látkám, často znečišťujícím životní prostředí, je prováděna především v tekutých médiích (nahromačovací kultivace), případně na plotnách ztužených agarem v případě, že sledovaná látka je ve vodě rozpustná nebo v médiu emulgovatelná.

U polyolefinů, které jsou inherentně odolné vůči půdní mikroflóře, však shora uvedené metody selhávají, protože na povrchu plastů buď není znatelný žádný růst, nebo je pozorován pouze nepatrný rozvoj mikroorganismů na stopách oligomerních látek přístupných pro mikroorganismy. Vlastní polymer však není asimilován, výběr aktivních kmenů vůči takovýmto plastům je nemožný. Výše uvedené nedostatky jsou odstraněny selektivní kultivační půdou pro mikroorganismy schopné růstu na plastech na bázi polyolefinů, která je vyznačena tím, že se skládá (v hmotnostních procentech) z 0,2 % KH_2PO_4 , 0,2 % K_2HPO_4 , 0,03 % MgSO_4 , 0,02 proc. peptonu, 0,025 % trifenylyltetrazoliumchloridu, 2,5 % agaru a 1 objemového procenta směsi polyethylen — minerální, nejlépe neinhibovaný transformátorový olej, který obsahuje 5 až 10 hmotnostních procent polyethylenů.

Způsob přípravy selektivní kultivační půdy je vyznačen tím, že k 0,5 až 1 g polyethylenové fólie libovolné tloušťky se přidá 10 mililitrů transformátorového oleje, směs se zahřívá v autoklávu po dobu 15 až 30 minut na teplotu 120°C a po rozpuštění plastů v oleji se roztok za horka přidá do základního média 80 až 100°C teplého, obsahujícího KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , pepton a mixuje v mixéru 2 až 5 minut rychlostí 6 až $12\,000\text{ ot. min}^{-1}$, po přidání agaru sterilizuje v autoklávu 20 minut při teplotě 120°C a těsně před litím do Petriho misek se v 5 ml destilované vody přidá trifenylyltetrazoliumchloridu, sterilizovaný paralelně s kultivační půdou.

Vynález je založen na poznatku, podle kterého je možné připravit emulze PE, je-li přidán a za horka rozpuštěn v minerálních olejích a na poznatcích, že kmeny bakterií aktivní vůči plastům na bázi polyolefinů mají

výraznou proteolytickou a lipolytickou aktivitu a jsou schopny asimilovat i plasty rozpuštěné a částečně degradované v minerálních olejích.

Selektivita půdy je dána zdrojem uhlíku, kterým je polyethylen rozpuštěný v minerálním oleji. Takovýto substrát asimiluje jen velmi malá skupina mikroorganismů, většinou až po delším pasážování na kapalných půdách s přidavkem plastu (např. kapalná půda obsahující pepton a masový extrakt s přidavkem práškového polyethylenů. Navelek se selektivita půdy projevuje v rozdílném zbarvení kolonií bakterií. Kmeny, které jsou schopny asimilovat polyethylen rozpuštěný v minerálním oleji, jsou zbarveny buď celé, nebo jejich středy červeně. Kmeny, které tuto vlastnost postrádají, jsou většinou bezbarvé nebo mají jiný barevný odstín.

Způsob použití selektivní kultivační půdy je patrný z následujícího příkladu:

Příklad 1

Selektivní kultivační půda je připravena podle receptury uvedené vpředu a je zaočkována výluhem z kompostové země. Po 3 až 7 dnech jsou vyhodnoceny kolonie vyrostlé na povrchu selektivní půdy. Kolonie zbarvené červeně (kolonie s červenými středy) mohou být izolovány a použity k další adaptaci.

Příklad 2

Připraví se selektivní kultivační půda podle receptury uvedené vpředu, přičemž do poloviny selektivní půdy je přidán roztok minerálního oleje s plastem, do druhé poloviny pouze minerální olej. Obě varianty se nalijí do Petriho misek a zaočkují sledovaným kmenem bakterií, např. zástupci rodů *Pseudomonas*, *Achromabacter*, *Flavobacterium*.

Z rozdílu růstu (intenzity barvy kolonie) v obou variantách půdy se soudí na míru adaptace studovaného kmene k minerálnímu oleji nebo k plastu rozpuštěnému v minerálním oleji.

Půdu je možné využít při vyhledávání potenčních biodeteriogenů k jejich dalšímu šlechtění a adaptaci i k sledování, zda daný mikroorganismus se přizpůsobuje změněným nutričním podmínkám.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Selektivní kultivační půda pro mikroorganismy schopné růstu na plastech na bázi polyolefinů, vyznačená tím, že se skládá v hmotnostních procentech z 0,2 % KH_2PO_4 , 0,2 % K_2HPO_4 , 0,03 % MgSO_4 , 0,02 % peptonu, 0,025 % trifenyltetrazoliumchloridu, 2,5 proc. agaru a 1 objemového procenta směsi polyethylen — minerální, nejlépe neinhibovaný transformátorový olej, která obsahuje 5 až 10 hmotnostních procent polyethylenů.

2. Způsob přípravy selektivní kultivační půdy pro mikroorganismy schopné růstu na plastech na bázi polyolefinů, vyznačený tím, že k 0,5 až 1 g polyethylenové fólie libovol-

né tloušťky se přidá 10 ml transformátorového oleje, směs se zahřívá, nejlépe v autoklávu po dobu 15 — 30 minut na teplotu 120°C a po rozpuštění plastů v oleji se roztok za horka přidá do základního média 80 až 100°C teplého, obsahujícího KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 a pepton, mixuje v mixéru 2 až 5 minut, rychlostí 6 až $12\,000\text{ ot. min}^{-1}$, po přidání agaru sterilizuje v autoklávu 20 minut při teplotě 120°C a těsně před litím do Petriho misek se v 5 ml destilované vody přidá trifenyltetrazoliumchlorid, sterilizovaný paralelně s kultivační půdou.