

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

268 012

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/04

(21) PV 4608-87.R
(22) Přihlášeno 22 06 87

(40) Zveřejněno 12 07 89
(45) Vydáno 31 07 90

(75)

Autor vynálezu OPEKAROVÁ MIROSLAVA RNDr., CSc.,
JANDA IVAN, RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Způsob konzervace luminiscentních bakterií
lyofilizací

(57)

Konzervace luminiscentních bakterií zahrnuje lyofilizaci v kryoprotektivním médiu s nižší iontovou silou-(1 % NaCl), které obsahuje 15 % laktosu a 5 % rozpustný škrob. Dehydratované kultury se uchovávají v evakuovaném stavu v chladu a před použitím se rekonstituují přidavkem původního objemu 2 % NaCl.

Vynález se týká způsobu koncentrace luminiscentních bakterií lyofilizací pro potřeby mikrobiálního testu toxicity nebo dlouhodobého uchovávání ve sbírkách.

Některé mořské bakterie (např. z rodů *Photobacterium* a *Vibrio*) se vyznačují intenzivní bioluminiscencí, tj. produkcí viditelného světla. S bioluminiscencí interferují nejrůznější toxické látky, např. ionty těžkých kovů, pesticidy, organická rozpouštědla, syntetická hnojiva aj., které mohou z vnějšího prostředí pronikat dovnitř buněk luminiscentních bakterií. Ze změn intenzity bioluminiscence je možno usuzovat na toxicitu neznámých vzorků, popřípadě u známých toxikantů stanovit jejich koncentraci. Rutinně se mikrobiální test toxicity provádí pomocí luminiscenčního fotometru a speciálně připravených dehydratovaných luminiscentních bakterií, jejichž luminiscence se měří v přítomnosti a nepřítomnosti potenciálního toxikantu (tzv. Microtox test: Bulich A. A., *Process Biochem.* 17, 45 až 47, 1982). Metoda je vhodná jako primární screening při kontrole čistoty životního prostředí.

V literatuře byly popsány metody, jimiž je údajně možné buňky fotobakterií lyofilizovat tak, aby nejen přežily ve vysušeném stavu několik měsíců, ale byly i okamžitě po rehydrataci schopné bioluminiscence. Podle jedné metody (Nealson K. H., *Methoda Enzymol.* 57, 153 až 166, 1978) se buňky luminiscentních bakterií resuspendují v médiu s nižší iontovou silou, která obsahuje cca 0,75 % hmot. NaCl, další anorganické soli, 0,5 % hmot. pepton a 0,5 % hmot. kvasničný extrakt, zmrazí se a lyofilizují. Druhý způsob (patentový spis NSR č. 28 41 8964) používá před lyofilizací suspendování fotobakterií v 2 % hmot. roztoku NaCl obsahujícím 20 % hmot. odtučnělého mléka.

Nevýhodou těchto metod je, že neposkytují reprodukovatelné výsledky pro široké spektrum druhů luminiscentních bakterií, zásadním nedostatkem je, že stupeň přežití a intenzita bioluminiscence konzervovaných buněk jsou nízké. Komerčně vyráběné konzervy fotobakterií pro Microtox test jsou velmi drahé. V zemích RVHP nebyla technologie sériové výroby dehydratovaných fotobakterií dosud zavedena.

Fakt, že luminiscentní bakterie se nedají běžnými způsoby spolehlivě lyofilizovat, je také velkým problémem pro sbírky mikroorganismů. Dosud používané způsoby dlouhodobé konzervace těchto bakterií jsou buď nákladné (uchovávání v kapalném dusíku), nebo pracné a nepohodlné (uchovávání na agarových půdách v chladničce a časté přeočkovávání).

Tyto nevýhody odstraňuje způsob konzervace luminiscentních bakterií podle vynálezu, jehož podstatou je, že bakteriální buňky se lyofilizují v lyofilním médiu, které obsahuje jako kryoprotektivní látku laktózu v koncentraci 10 až 25 % hmot. a jako látku usnadňující rehydrataci rozpustný škrob v koncentraci 1 až 10 % hmot. a před použitím se rehydratují roztokem uni-univaletního elektrolytu, s výhodou NaCl, jehož koncentrace před lyofilizací je 0,8 až 1,2 % hmot., přičemž rehydratace se provádí doplněním do původního objemu přidávkou 2% roztoku NaCl. Buňky luminiscentních bakterií narostlé v kapalném médiu nebo na pevné půdě se resuspendují v lyofilním médiu s nižší koncentrací NaCl (např. 1 %), které obsahuje laktózu jako kryoprotektivní látku a škrob jako látku, jež usnadňuje pozdější rehydraci; tato suspenze se dále lyofilizuje obvyklým způsobem. Lyofilizát se uloží v evakuované nádobě v chladu (kolem 4 °C). Před použitím se lyofilizovaná kultura rekonstruuje do původního objemu přidávkou roztoku NaCl tak, aby výsledná koncentrace NaCl byla optimální pro bioluminiscenci (kolem 3 %). Za těchto podmínek vykazují rehydratované buňky intenzivní a stabilní bioluminiscenci, takže jich lze použít pro Microtox test. Resuscitace sbírkových kmenů se provádí obvyklým způsobem, např. suspendováním v růstovém m= médiu.

Způsob konzervace luminiscentních bakterií podle vynálezu zajišťuje:

1. vysoký stupeň přežití bakteriálních buněk i po několika měsících skladování;
2. jednoduchou skladovatelnost konzervovaných kultur, což umožňuje provádět testy toxicity v terénu;
3. snadnou rehydrataci vysušeného materiálu, která je podmínkou reprodukovatelného

a správného rozdělování luminiskující kultury na alikvotní části na začátku testu;
4. dostatečně silnou a stálou luminiscenci konzervovaných buněk po rehydrataci.

Dále je uveden příklad použití metody podle vynálezu. Je popsána jen jedna z možností provedení - konkrétním hodnotám koncentrací, teploty, tlaku a jiných veličin nelze přiřítat omezující význam vzhledem k ochraně vynálezu.

Příklad 1

Luminiscentní bakterie *Photobacterium leiognathi* LN-1a, byly kultivovány na rotační třepačce při 22 °C v živném médiu obsahujícím (g/L): KH_2PO_4 , 2,5; NaCl, 30,0; NH_4Cl , 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,4; FeCl_3 , 0,005; glycerol, 5,0; kvasničný extrakt (SERVA, NSR) 1,0; trypton (OXOID, Velká Británie) 15,0 (pH 7,1). Kultura v pozdní logaritmické fázi byla ochlazená v ledu, buňky byly odděleny centrifugací a resuspendovány v 3 % hmot. NaCl na koncentraci $1,4 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$. Alikvotní části (0,04 mL) byly přidávány k 0,5 mL lyofilního média obsahujícího ve 100 mL: 1 g NaCl, 23 mg pyrofosforečnanu sodného (dekahydrátů), 0,5 mg kvasničného extraktu (SERVA), 15 g laktozy a 5 g rozpustného škrobu (podle Louliera; LACHEMA).

Část této suspenze byla použita pro zjištění intenzity bioluminiscence a koncentrace živých buněk. Počet buněk schopných tvořit kolonie byl zjištěn výsevem ředěné suspenze na Petriho misky obsahující 2 % hmot. agar v živném médiu výše uvedeného složení a inkubací při 22 °C. Luminiscence bakteriální suspenze byla měřena při 15 °C v luminiscenčním fotometru Microtox model 2055 (BECKMAN, USA) při nastavení zisku fotonásobiče 4,00 až 0 9,50 x 1 (Bulich A. A., Process Biochem. 17, 45 až 47, 1982).

Ostatní vzorky byly ihned po suspendování zmrazeny ve směsi led/etylalkohol a lyofilizovány v lyofilizátoru (HETOSICC CD 52-1; HETO, Dánsko) při vakuu 7 Pa po dobu 3,5 h. Vysušené preparáty byly v evakuovaném stavu zataveny do skloněných zkumavek a uloženy při 2 až 4 °C.

Po 90 dnech skladování v chladu byly konzervované kultury resuscitovány přidáním 0,5 mL a 2 % hmot. NaCl (takže výsledná koncentrace NaCl byla 3 %). Bioluminiscence a životaschopnost rehydratovaných buněk byla testována stejnými metodami jako před lyofilizací. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce.

Příklad 2

Stejně jako v příkladu 1 bylo postupováno při konzervaci luminiscentních bakterií *Photobacterium phosphoreum* MVI 02.

Příklad 3

Stejně jako v příkladu 1 bylo postupováno při konzervaci luminiscentních bakterií *Vibrio fischeri* MJ-1.

Z tabulky je zřejmé, že u všech studovaných mikroorganismů je lyofilizací podle vynálezu schopnost tvorby kolonií redukována na hodnoty, které jsou pro sbírkové účely zcela dostatečné. Celková bioluminiscence kultur je snížena na 1/10 až 1/4 původní hodnoty před lyofilizací, což velmi dobře vyhovuje potřebám mikrobiálního textu toxicity.

Tabulka

Vliv konzervační metody podle vynálezu na životaschopnost a bioluminiscenci fotobaktérií

Mikroorganismus	Schopnost tvorby kolonií ^a		Bioluminiscence ^b	
	před lyof.	90 dnů po lyof.	před lyof.	90 dnů po lyof.
P. phosphoreum MVI 02	$4,28 \times 10^9$	$1,48 \times 10^8$	695	65
P. leiognathi LN - 1a	$2,04 \times 10^9$	$5,70 \times 10^8$	191	48
V. fischeri MJ-1	$4,40 \times 10$	$6,81 \times 10^8$	944	243

^a = přepočteno na koncentraci životaschopných buněk v 1 mL suspenze (průměr z 5 hodnot)

^b = V arbitrárních jednotkách displeje luminometru Microtox 2055. Měřena byla vždy luminiscence 0,01 mL bakteriální suspenze v 0,5 mL 3 % hmot. NaCl (průměr ze 3 hodnot).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob konzervace luminiscentních bakterií lyofilizací, vyznačující se tím, že bakteriální buňky se lyofilizují v lyofilním médiu, které obsahuje kryoprotektivní látku laktozu v koncentraci 10 až 25 % hmot a jako látku usnadňující rehydrataci rozpustný škrob v koncentraci 1 až 10 % hmot. a před použitím se rehydratují roztokem uni-uni-valentního elektrolytu, s výhodou NaCl, jehož koncentrace před lyofilizací je 0,8 až 1,2 % hmot., přičemž rehydratace se provádí doplněním do původního objemu přidávkem 2 % roztoku NaCl.