



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

234379

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 R 1/125

(22) Přihlášeno 05 04 83
(21) (PV 7536-82)

(40) Zveřejněno 31 08 84

(45) Vydáno 15 10 86

(75)
Autor vynálezu

LAKOTA VLADIMÍR ing. CSc., BASTL VLADIMÍR ing., SLUŠOVICE,
ČERNÝ MIROSLAV RNDr. ing., PRAHA, PALEČKOVÁ FRANTIŠKA RNDr.,
SLUŠOVICE, ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Způsob šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis* a vyšlechtěný kmen

Vynález se týká způsobu šlechtění mikro-
organismu *Bacillus subtilis* pomocí muta-
genních zářivých světla o vlnové délce
253,7 nm neb N-nitroso-ethylmočovinou
a 3 až 4násobné selekce, čímž se získá
kmen schopný sporulovat v 85 až 90 %
populace.

Vynález se týká způsobu šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis*, např. jeho kmene BS 20, za účelem získání nového kmene s mohutnou sporulací a jeho využití pro ovlivňování střevní mikroflory hospodářských zvířat.

Životní cyklus sporulujících mikroorganismů je tvořen dvěma odlišnými fázemi: vegetativním růstem a sporulací. Kontrola vegetativního růstu vylučuje však sporulaci a obráceně. Oba procesy se odlišují v několika aspektech: v nárokování energie, v enzymové aktivitě, ve výživových nárocích apod. V nejjednodušší formě se regulace projevuje "načasovanou" syntézou některých mikrobiálních enzymů a produktů.

Účelem vynálezu je vypracovat způsob šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis* za účelem získání nového kmene s mohutnou sporulací a jeho využití pro ovlivnění střevní mikroflory některých hospodářských zvířat. Výchozím materiálem pro šlechtění je kmen, označený BS 20, který se vyznačuje slabou sporulací, takže vysporulovává jen 60 % populace a na masopeptonovém agaru tvoří kolonie různého tvaru a povrchu od draných až po hladké a s pravidelným až laločnatým okrajem.

Způsob šlechtění a selekce kmene BS 20 mikroorganismu *Bacillus subtilis*, jehož sporulace je omezená, spočívá v tom, že se suspenze jeho spor ozařuje UV světlem germicidní lampy s maximem záření v oblasti vlnové délky 253,7 nm o výkonu $10,7 \text{ J/m}^2/\text{s}$ ze vzdálenosti 20 až 25 cm po dobu 60 až 90 s, případně že se na kulturu jeho vegetativních buněk působí N-nitrosoethylmočovinou ve vodném roztoku s hodnotou pH 6,0 a v koncentraci $5 \cdot 10^{-1} \text{ mM}$ po dobu 60 až 90 min, načež se izolují mutanty, které se dále selektují. Při selekci se sledují izoláty se zvýšenou schopností sporulace a tím je dosaženo plně sporulujícího kmene SP^{++} , u kterého vysporuluje 85 až 90 % populace.

Principem je aplikace mutagenu na sporovou suspenzi nebo na suspenzi vegetativních buněk. Jako mutageny je možno použít nitroso- a thio-sloučeniny charakterizované methyl- a alkyl-aktivitou, a to přednostně na vegetativní buňky, nebo UV záření či gamma-paprsky na sporovou suspenzi. Pro získání kmene SP^{++} je s výhodou použito fyzikálních mutagenů. Roztoky mutagenů se připravují v koncentraci řádově $1 \cdot 10^{-1} \text{ mM}$ a působí se jimi 60 až 90 min.

Výchozí sbírkový kmen BS 20 mikroorganismu *Bacillus subtilis*, který se vyznačuje menší sporulací, tvoří na masopeptonovém agaru kolonie rozličného tvaru a povrchu, od draných až po hladké, s okrajem pravidelným až laločnatým. Mutagenním zásahem a následující dvou až třinásobnou selekcí se získá nový kmen *Bacillus subtilis* GCM 3 623, který na masopeptonovém agaru tvoří převážně drané kolonie a neprodukuje pigment, nebo jen pigment slabě hnědavý, difundující do živné půdy, a který se vyznačuje mohutnou sporulací (SP^{++} 85 až 90 %). Jeho spóry jsou odolné vůči zahřívání do 80°C po dobu 30 až 45 min. Pro svoji odolnost je schopen dlouhodobým podáváním ovlivnit mikroflóru zažívacího traktu hospodářských zvířat a umožnit tak i plné využití podávaného krmiva.

Získanou vlastnost mohutné sporulace lze prokázat na sporulačních půdách, např. na masopeptonovém agaru, na A de King-agaru apod., ale z hlediska praktického i při submerzní kultivaci na třepacím stroji.

V souhlase s poznatky humánní medicíny zůstávají spory *Bacillus subtilis* podané v dostatečném množství v dietě žaludkem nedotčeny účinkem nízkého pH a trávicích enzymů. Klíčení spor začíná až v tenkém střevě a kultura se vyvíjí do vegetativní formy vlivem tepla, vlhkosti a složení prostředí. Je nutné, aby klíčení spor a vývoj vegetativních buněk byl dostatečně rychlý vzhledem k pohybu materiálu v zažívacím traktu. Při klíčení se uvolňují bakteriolytické enzymy, které působí na ostatní nežádoucí mikroflóru a dochází k vytvoření přirozeného poměru přítomných mikroorganismů, např. coliformních bakterií a enterokoků apod. Tím je dána i větší odolnost zvířete k nákazám zažívacího traktu.

Příklad kultivace vyšlechtěného kmene *Bacillus subtilis* sbírkového označení ČCM 3 623: Kulturou tohoto kmene, vyrostlou na šikmém masopeptonovém agaru při 37 °C za dobu 4 až 5 dní a pak uloženou v chladničce při +5 °C, se pomocí kličky očkuje 80 ml půdy v Erlenmayerově baňce o objemu 750 ml. Živná půda má toto složení:

kukuřičná mouka	1,8 % hmot.
glukóza	1,8 % hmot.
kukuřičný extrakt	1,0 % hmot.
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0,2 % hmot.
CaCO ₃	0,3 % hmot.
H ₂ O	zbytek

Hodnota pH půdy se neupravuje. Sterilizace této živné půdy se provádí při teplotě 120 °C po dobu 30 min. Baňky se kultivují na rotační třepačce s 240 ot/min a s výchytkou 25 mm při teplotě 37 °C po dobu 48 až 54 hodin. Sporulace se zjišťuje výsevem suspenze po 15 minutovém zahřívání na teplotu 75 °C na sporulační půdu a pro kontrolu sporulace slouží nazahřívání suspenze. Kultura sporuluje v rozmezí 85 až 90 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis*, např. jeho kmene, označeného BS 20, vyznačující se tím, že se suspenze jeho spor ozařuje UV světlem germicidní lampy s maximem záření v oblasti vlnové délky 253,7 nm o výkonu 107 J/m²/s ze vzdálenosti 20 cm po dobu 60 až 90 s, případně že se na kulturu jeho vegetativních buněk působí N-nitroso-ethylmočovinou ve vodném roztoku s hodnotou pH 6,0 a v koncentraci 5.10⁻¹ mM po dobu 60 až 90 min, načež se izolují mutanty, které se pak podrobí selekcím, přičemž se sledují izoláty se zvýšenou schopností sporulace a po 3 až 4 selekčních pokusech se získá izolát schopný sporulace v 85 až 90 % populace.

2. Vyšlechtěný kmen mikroorganismu *Bacillus subtilis* sbírkového označení ČCM 3 623, schopný sporulace v 85 až 90 % populace, jehož spory jsou rezistentní k tepelnému namáhání do 85 °C po dobu 30 až 45 min.