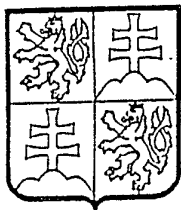


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 277033

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 3510-89
(22) Přihlášeno : 09.06.89
(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 17.06.92
(47) Uděleno : 30.09.92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 1/20
//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:065)
(C 12 N 1/20, C 12 R 1:41)

(73) Majitel patentu : Bartoníček Bohumil ing. CSc., Praha, CS;
Marečková Hana RNDr. CSc., Praha, CS;
Pačour Jaroslav ing., Kounice, CS;
Pipota Jiří ing., Kralupy nad Vltavou, CS;
Pohunková Jarmila, Strančice, CS

(72) Původce vynálezu : Bartoníček Bohumil ing. CSc., Praha, CS;
Marečková Hana RNDr. CSc., Praha, CS;
Pačour Jaroslav ing., Kounice, CS;
Pipota Jiří ing., Kralupy nad Vltavou, CS;
Pohunková Jarmila, Strančice, CS

(54) Název vynálezu : Způsob kultivace bakterií rodu Rhizobium a Azotobacter

(57) Anotace :

Kultivace hlízkových bakterií na rašelino-
vém substrátu se provádí zaočkováním bakte-
rií do hermeticky uzavřeného rašelinového
substrátu, který byl sterilizován ionizují-
cím zářením dávkou 20 až 50 kGy.

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu kultivace bakterií rodu *Rhizobium* a *Azotobacter* na rašelinovém substrátu.

Dosavadní stav techniky

Současná technologie výroby očkovacích látek např. podle čs. patentu č. 148327 zahrnuje výběr provozních kmenů *Bacterium Rhizobium* a vlastní technologii výroby, u které, vedle přípravy matečných kultur, je rozhodující pro kvalitu preparátu příprava nosného substrátu. Jako nosný substrát se používá směs mleté rašeliny s tuhou, upravená přidávkem mletého vápna na hodnotu pH 7. Prosátý substrát se sterilizuje v autoklávech pod tlakem páry 200 kPa po dobu 3 hodin. Vychladlý substrát se zaočkuje tekutou kulturou rhizobií a v uzavřené nádobě se skladuje při teplotě 28 °C k rozmnožení rhizobií tak, aby jejich titr nebyl nižší než 100 milionů buněk v 1 g. Tepelná sterilizace má řadu nevýhod. Mezi ně patří zejména skutečnost, že sterilizace není dokonalá vzhledem ke špatným tepelně vodivostním vlastnostem rašeliny, dále že dochází k lokálnímu přehřívání, které vede k tepelnému rozkladu rašeliny za vzniku toxických látek negativně působících na vývoj hlízkových bakterií. Dosažený stupeň sterility při autoklávování je poměrně nízký, zbytek zárodků plísni dosahuje počtu 10^2 až 10^4 živých buněk v 1 g a při následné kultivaci plísně konkurují bakteriím, čímž do určité míry omezují jejich rozmnožení. Takto připravený přípravek má titr rhizobií 10^8 živých buněk v 1 g přípravku max. po dobu 6 měsíců a potom titr výrazně klesá a naopak stoupá titr plísni a kvasinek, což není žádoucí.

Podstata vynálezu

Podstata způsobu kultivace bakterií rodu *Rhizobium* a *Azotobacter* na rašelinovém substrátu spočívá podle vynálezu v tom, že se uvedené bakterie zaočkovávají do hermeticky uzavřeného rašelinového substrátu, který byl sterilizován ionizujícím zářením v dávce 20 až 50 kGy.

Způsobem podle vynálezu je přírodní rašelina smíchána s mletým vápencem v takovém poměru, aby výsledná hodnota pH byla v rozmezí 6,2 až 6,9. Po přidání fosforu, draslíku a stopových prvků se rašelina suší v sušárně na konečný obsah vody max. 10 % hmotnosti. Usušená rašelina se mele a prosévá, aby se zbavila zbytků dřeva a hrubších zrn a současně se na sítích třídí tak, aby alespoň 70 % částic mělo velikost menší než 60 µm. Vytríděná rašelina se mísí s tuhou a v míchačce se zvlhčuje na obsah vody 20 až 25 % hmotnosti. Takto připravený substrát je pak sterilizován ionizujícím zářením, tj. gama zářením, nebo urychlenými elektrony a sterilizace probíhá za teploty 20 až 25 °C. Sterilizující dávky se pohybují v rozmezí 25 až 50 kGy v závislosti na počátečnímu počtu zárodků plísni, aktinomycet a kvasinek. Rašelina je sterilována přímo v zatavených sáčkích z polyethylenu a po ozáření je dosaženo úplné sterility, kterou lze udržet v hermeticky uzavřeném sáčku po 18 měsíců beze změny. Na rozdíl od

tepelné sterilizace neobsahuje substrát ani jiné cizí látky, např. toxické produkty pyrolýzy rašeliny. Zaočkování tekutou kulturou se provádí propíchnutím sáčku sterilní dutou jehlou a napuštěním kultury do substrátu. Díky nepřítomnosti konkurenčních mikroorganismů a toxických pyrolýzních produktů se dosahuje počtu vypěstovaných bakterií např. *Rhizobium Meliloti* D 417 nad hodnotu 10^9 v 1 g přípravku.

Kontrola přípravku po 16ti měsících od data výroby zjistila $1,51 \times 10^{12}$ živých buněk rhizobií v 1 g přípravku (*Rhizobium Meliloti* D 417).

Podobných výsledků bylo dosaženo i pro ostatní kultury, tj. hrách, pelušku, vikev, bob a jetel.

Po zaočkování nosného substrátu kulturou *Azotobacteria* kmenem A 27 bylo při kontrole po 14ti měsících od data výroby zjištěno $1,32 \times 10^9$ živých buněk *Azotobacteria* v 1 g přípravku.

Způsobem podle vynálezu probíhá kultivace mikroorganismů na zcela sterilním rašelinovém substrátu, připraveném radiační sterilizací.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

54 kg vytríděné rašeliny o hodnotě pH 6,2 a počáteční vlhkosti 7 %
6 kg tuhy
se smíchá a přidá se 15 l vody.

Uvedená směs se plní do 100 polyethylenových sáčků o síle folie 0,10 mm, zataví a radiačně sterilizuje dávkou záření 25 kGy. Takto připravený substrát se inokuluje tekutou kulturou *Rhizobium Meliloti* D 417 v množství 300 ml/l sáček o titru minimálně 10^{10} živých buněk v 1 ml. Kultivace probíhá při teplotě 20 až 25 °C po dobu 10 dnů. Po namátkové kontrole, kdy se ověří očekávaná výše titru min. 10^9 živých buněk v 1 g přípravku, se hotový přípravek do roka použije. Bylo ověřeno, že u takto připraveného přípravku ani po 18 měsících skladování neklesne titer bakterií řádově pod 10^9 živých buněk v 1 g přípravku.

Příklad 2

Podle postupu v příkladu 1 se připravily sáčky se substrátem, který byl jednotlivě zaočkován těmito tekutými kulturami:

<i>Rhizobium Trifolii</i>	D 15 , D 20 , D 544 , T 16
-"- <i>Leguminosarum</i>	D 560 , D 564 , T 97 , T 117
-"-	D 28 , E 23 , N 30 , T 79
-"- <i>Japonicum</i>	D 538 , D 344 , D 536 , D 563
-"- <i>Lupini</i>	D 75 , D 51 , D 52
-"- <i>Meliloti</i>	D 469 , D 470 , D 472 , D 557
<i>Azotobacter</i> kmen	A 27 , A 33 , A 36

Všechny použité kultury mikroorganismů jsou uloženy ve sbírce ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze - Ruzyni.

Průmyslová využitelnost

Způsob kultivace hlízkových bakterií rodu Rhizobium a Azotobacter na radiačně sterilizovaném substrátu umožňuje sterilní inokulaci každé dávky očkovací látky, při dosažení titru pěstovaných bakterií řádově nad 10^9 živých buněk v 1 g přípravku a udržení tohoto titru po dobu více než 12 měsíců.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob kultivace bakterií rodu Rhizobium a Azotobacter na rašelinovém substrátu, vyznačující se tím, že se uvedené bakterie zaočkovávají do hermeticky uzavřeného rašelinového substrátu, který byl sterilizován ionizujícím zářením v dávce 20 až 50 kGy.

Konec dokumentu
