



ŘÍDÍ PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217647
(11) (B1)

[22] Přihlášeno 15 07 81
[21] (PV 5432-81)

[51] Int. Cl.³
C 12 M 1/22

[40] Zveřejněno 30 04 82

[45] Vydáno 15 09 84

(75)

Autor vynálezu

POSPÍŠIL PETR ing., KOPŘIVNÍK BŘETISLAV RNDr. CSc., OLMOUC

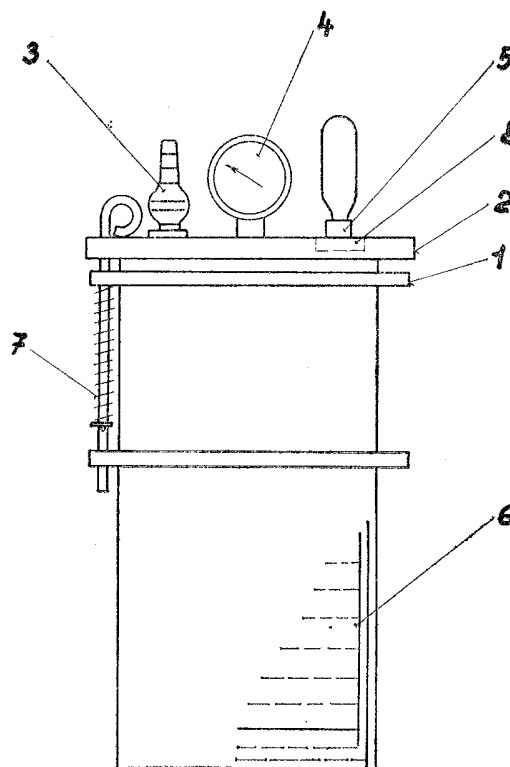
(54) Způsob a zařízení k anaerobní kultivaci bakterií

1

Vynález se týká způsobu anaerobní kultivace bakterií v atmosféře kysličníku uhličitého a kysličníku dusného při přetlaku maximálně 70 kPa. Vzduch z kultivačního prostředí se vytěsni kysličníkem uhličitým a ten se následovně smísí s kysličníkem dusným. Zařízení pro tento způsob kultivace se skládá z tlakové nádoby s těsnicím víkem, v němž je umístěn kohout pro vypouštění plynu, ventil pro napouštění plynu, manometr, bakteriologický filtr, uvnitř tlakové nádoby je umístěn vyjímatelný stojan na kultivační misky a těsnicí víko nádoby je uchyceno pružinovými držáky.

Vynálezu je možno použít ve zdravotnických zařízeních, školách, mikrobiologických ústavech.

2



Vynález se týká anaerobní kultivace bakterií, které se v současné době věnuje zvýšená pozornost, protože podíl anaerobů v klinickém materiálu, v potravinách i ve vodách stále stoupá. Dosavadní možnosti anaerobní kultivace jsou u převážné většiny bakteriologických pracovišť neuspokojivé.

Anaerobní kultivace je dosud prováděna v anaerostatech zahraniční výroby nebo tuzemské výroby. Tyto přístroje umožňují kultivaci v podmínkách anaerobního prostředí, které lze dosáhnout dvojím způsobem.

Princip prvního způsobu spočívá ve vytvoření silného podtlaku, čímž je z přístroje odstraněna větší část vzduchu, a anaerobní podmínky jsou upraveny dodatečným vpravením inertního plynu, nejčastěji kyslíčnicku uhličitého nebo dusíku, buď napuštěním z tlakové plynové bomby, nebo vyvíjením kyslíčnicku uhličitého chemickou cestou, například hořením svíčky, reakcí uhličitany s kyseliny a podobně.

Princip druhého způsobu spočívá v chemickém vyvíjení kyslíčnicku uhličitého a vodíku, přičemž je přítomný kyslík z prostředí odstraněn katalytickou cestou, například pomocí katalyzátoru s paládiem (systém OXOID).

Kromě uvedených principů byly v minulosti používány i jiné způsoby, například společná kultivace obligátně aerobních a anaerobních bakterií, kdy byl kyslík nejprve spotřebován růstem aerobních bakterií a teprve potom mohlo dojít k růstu anaerobů, nebo se používaly chemické látky, schopné prudké oxidace, během níž byl přítomný kyslík spotřebován, například pyrogalol a podobně. Tyto metody se však neosvědčily a v současné době se jich většinou neužívá.

U principů, pracujících s podtlakem, je nutno kultivovat Petriho misky dnem dolů, protože při správné poloze, tj. dnem vzhůru, při níž nedochází k sekundární kontaminaci, se v podtlaku odchyluje živné agarové médium. Bakteriální buňky jsou silným podtlakem částečně poškozovány, protože se při laboratorní teplotě prudce odpařuje voda. Zařízení, pracující s podtlakem, vyžaduje vybavení pracoviště výkonnou vývěvou a tlakovou plynovou bombou s CO_2 a N_2 , které musí být z bezpečnostních důvodů umístěny zvlášť. Při vakuaci dochází k silnému tvoření vodních par, které pak během kultivace kondenzují na stěnách přístroje a Petriho miskách, čímž zvyšují riziko kontaminace média a zvyšují i riziko bezpečnosti práce u patogenních kultur. Nevýhodou systému pracujícího s chemickým vyvíjením kyslíčnicku uhličitého a vodíku je riziko vzniku třaskavého plynu, takže je nutno pracovat v prostředí bez otevřeného plamene. Na riziko požáru upozorňuje sám výrobce tohoto zařízení.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob kultivace anaerobních bakterií podle vynálezu, který spočívá v tom, že se anaerobní bakterie kultivují v atmosféře kyslíčnicku

uhličitého a kyslíčnicku dusného při přetlaku max 70 kPa. Vzduch z kultivačního prostředí se vytěsni plynem o specifické váze vyšší než vzduch, například kyslíčnickem uhličitým, ten se následně promyje kyslíčnickem dusným. Zařízení k výše uvedenému způsobu kultivace se skládá z tlakové nádoby s těsnicím víkem, v němž je umístěn kohout, manometr a ventil pro napouštění inertního plynu, jemuž je předřazen bakteriologický filtr, a uvnitř tlakové nádoby je umístěn vyjímatelný stojan na Petriho misky. Těsnicí víko nádoby je zajištěno pružinovými uzávěry, které dovolí regulovat přetlak plynu v tlakové nádobě a umožňují odpuštění vzduchu a ostatních plynů.

Práce s anaerostatem je velmi jednoduchá a bezpečná. Po vložení naočkovaných Petriho misek (dnem vzhůru) se anaerostat ventilu pro napouštění plynu se vpusť z bombičky kyslíčnicku uhličitý. (Bombičky jsou běžně v prodeji.) Vpouštěný plyn prochází přes rozptylovací komoru s vatovým bakteriologickým filtrem. Rozptylovací komora zabraňuje bodovému náporu vpouštěného plynu a současně zachycuje větší část bakteriální kontaminace plynů. Víko je upevněno k vlastní nádobě s pružinovými držáky, které zastávají současně funkci redukčního ventilu, konstruovaného k udržení požadovaného přetlaku 60 až 70 kPa. Nadbytečný přetlak se při napouštění inertního plynu z bombičky automaticky odpustí. Přetlakem je z anaerostatu vytlačen vzduch, který unikne pod těsněním víka. Vytěsnění vzduchu je umožněno jednak větší specifickou hmotností kyslíčnicku uhličitého, jednak větší hustotou, způsobenou rozdílem teplot vzduchu a napouštěného kyslíčnicku uhličitého. (Rozdíl činí až 30°C .) Zbýlý přetlak, cca 60 kPa se odpustí pomocí pružinového držáku a anaerostat se z bombičky s kyslíčnickem dusným naplní stejným způsobem. Pro vlastní kultivaci se konečný přetlak pružinovým držákem upraví na 20 až 30 kPa. Tím je přístroj připraven ke kultivaci. Poměr plynů $\text{CO}_2 : \text{N}_2\text{O}$ je 1 : 2.

Během manipulace není třeba přístroj přenášet z místnosti, odpadá potřeba výkonné olejové vývěvy, lze pracovat přímo v terénu, odpadá potřeba elektrické energie, velkých plynových lahví. V kultivačním přetlaku se netvoří nadbytečná vodní pára, kultivaci lze provádět v poloze dnem vzhůru. Kolonie rostou izolovaně, netvoří povlaky. Přístroj nahrazuje dovážené anaerostaty, včetně dovážených chemikálií a paládiového katalyzátoru. Zvyšuje bezpečnost práce, zlepšuje dosavadní podmínky anaerobní kultivace, šetří náklady na pořizování vývěvy, instalačních prací při provozování velkých plynových lahví. Mnohonásobně práci urychluje (uzavření anaerostatu a příprava ke kultivaci trvá cca 2 min.). Přístroj lze použít i k přepravě materiálu určeného k anaerobní kultivaci do laboratoří.

Na výkresu je schematicky znázorněno zařízení pro anaerobní kultivaci bakterií. Je tvořeno tlakovou nádobou 1 z umělé hmoty s obsahem asi 2 litry s umělohmotným těsnicím víkem 2, v němž je umístěn vypustný kohout 3, manometr 4, napouštěcí ventil 5 pro napouštění inertního plynu (kysličník uhličitý a kysličník dusný), z malých tlakových bombiček na domácí výrobu sifonu a šlehačky. Při napouštění plyn prochází bakteriologickým filtrem 8. Uvnitř tělesa anaerostatu je umístěn vyjímatelný stojan 6 na 10 Petriho misek s průřezem 10 cm. Přístroj má jištění proti přetlaku většímu než 100 kPa. Jištění je zajištěno pružinovými uzávěry 7, které dovolí odpustit větší přetlak a dále zajišťují dokonalý přetlak těsnicího víka 2. Provozní tlak v nádobě 1 je 30 kPa.

Se zařízením se pracuje následovně. Do anaerostatu se vloží naočkované Petriho

misky dnem vzhůru. Nádoba se uzavře a pomocí otočné rukojeti se vpustí obsah bombičky s kysličníkem uhličitým. Kysličník uhličitý je dodáván v přečištěném stavu (pro potravinářské účely), nemá proto vedlejší baktericidní nebo bakteriostatické účinky. Protože je cca 1,5krát těžší než vzduch, vytvoří přetlak s tím, že vzduch vytlačí do horní části anaerostatu. Po 5 minutách se přetlak s anaerostatu plynovým kohoutem vypustí a kohout se opět uzavře. Tím se z anaerostatu vypudí převážná část původního vzduchu. Z bombičky s N_2O se anaerostat naplní přetlakem N_2O , který se částečným odpuštěním tenze plynu upraví na 30 kPa. Tím je anaerostat připraven k inkubaci. Anaerostat je konstruován s dostatečnou bezpečnostní rezervou na přetlak, navíc je víko uchyceno pružinovými držáky, které fungují jako pojistný ventil.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob kultivace anaerobních bakterií, vyznačující se tím, že se anaerobní bakterie kultivují v atmosféře kysličníku uhličitého a kysličníku dusného při přetlaku maximálně 60 kPa.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se vzduch z kultivačního prostředí vytěsni plynem o specifické hmotnosti vyšší než vzduch, například kysličníkem uhličitým, ten se následovně smísí s kysličníkem dusným.

3. Zařízení podle bodů 1 a 2 vyznačující

se tím, že se skládá z tlakové nádoby (1), s těsnicím víkem (2), v němž je umístěn vypouštěcí kohout (3), manometr (4) a napouštěcí ventil (5), jemuž je předřazen bakteriologický filtr (8), uvnitř tlakové nádoby (1) je umístěn vyjímatelný stojan (6) na Petriho kultivační misky a těsnicí víko (2) nádoby (1) je uchyceno pružinovými držáky (7).

4. Zařízení podle bodu 3 vyznačující se tím, že napouštěcí ventil (5) a vypouštěcí kohout (3) je spřažen.

217847

