



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2019.08); C12Q 1/04 (2019.08); C12R 1/07 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019116595, 29.05.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.05.2019Дата регистрации:
03.02.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.05.2019

(45) Опубликовано: 03.02.2020 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
"Алтайский государственный университет",
ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Шипунов Борис Павлович (RU),
Яценко Елена Сергеевна (RU),
Парфенов Михаил Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ШИРОКИХ А.А. и др."Методические подходы к изучению
микроорганизмов прикорневой зоны
растений"//Сельскохозяйственная биология,
2007, N 1, с.43-54. ПИНЧУК И.П. и др.
"Численность, биомасса и размеры клеток
бактерий в ризосфере и ризоплане некоторых
растений"//Теоретическая и прикладная
экология, 2014, N 3, р.102-108. SU 1703681 A1,
07.01.1992.(54) Способ выделения бактерий р. *Bacillus* из ризопланы и ризосферы прикорневой зоны растений

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ выделения бактерий р. *Bacillus* из ризопланы и ризосферы прикорневой зоны растений. Способ включает выдерживание измельченных корней растений совместно с прилегающими частичками почвы в серной кислоте с концентрацией от 75% до 96% и

температурой $t=20-250^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5-3 мин, посев на L-агар и культивацию при 37°C в течение 24 ч. Изобретение обеспечивает выделение небольшого количества колоний бактерий из ризопланы и ризосферы прикорневой зоны растений для дальнейшей идентификации по видовым признакам. 1 табл., 1 пр.

RU 2 713 120 C1

C1 0 2 1 3 1 2 0 RU



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/20 (2019.08); C12Q 1/04 (2019.08); C12R 1/07 (2019.08)

(21)(22) Application: **2019116595, 29.05.2019**

(24) Effective date for property rights:
29.05.2019

Registration date:
03.02.2020

Priority:
(22) Date of filing: **29.05.2019**

(45) Date of publication: **03.02.2020** Bull. № 4

Mail address:
**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Shipunov Boris Pavlovich (RU),
Yatsenko Elena Sergeevna (RU),
Parfenov Mikhail Yurevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**

(54) **METHOD FOR EXTRACTING p.BACILLUS BACTERIA FROM RHIZOPLANES AND RHIZOSPHERES OF THE ROOT ZONE OF PLANTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention relates to the biotechnology. Disclosed is a method of extracting bacteria p. Bacillus of rhizoplanes and rhizospheres of root zone of plants. Method involves holding of milled plant roots together with adjacent soil particles in sulfuric acid with concentration of 75 % up to 96 % and temperature t=20-250 °C for 1.5-3 minutes,

inoculating on L-agar and culturing at 37 °C for 24 hours.

EFFECT: invention provides recovering a small amount of bacteria colonies from the rhizoplane and rhizosphere of the root zone of plants for further identification by species.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

RU 2 713 120 C1

RU 2 713 120 C1

Изобретение относится к биотехнологии бактерии, в первую очередь - к технологии извлечения природных штаммов из ризопланы и ризосферы прикорневой зоны растений. Изобретение предназначено для селективного извлечения «диких» штаммов спорообразующих бактерий, в первую очередь - р. BACILLUS, обладающих

5 уникальными биопродуцентными характеристиками, что позволяет сократить затраты на получение искусственных штаммов.

Известен способ извлечения бактерий из ризопланы и ризосферы прикорневой зоны растений, включающий следующие операции: корни с почвой помещают в колбу, содержащую 100 мл стерильной воды, и взбалтывают в течение 2 мин. Стерильным

10 крючком или пинцетом корни извлекают из колбы и переносят в другую емкость, содержащую 100 мл стерильной водопроводной воды. Процедуру повторяют, последовательно промывая корни в семи колбах (по 2 мин в каждой). Желательно, чтобы в последней (седьмой) колбе в воду перед стерилизацией было добавлено 5-7 г песка. Суспензию после первого отмывания рассматривают как образец ризосферы.

15 Содержимое остальных шести колб сливают вместе и рассценивают как образец ризопланы [Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. / Практикум по микробиологии, Учебники и учеб. пособия для высш. учеб. заведений. Изд. 4-е перер. и доп. М., «Колос» 1993, с. 121-123].

Недостатком данного способа является почти полное отсутствие селективности, что

20 приводит к длительным процессам последующей селекции.

Известен способ выделения бактерий ризопланы тыквы обыкновенной. Способ осуществляется по методу последовательных отмываний корней [Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер. - М.: Дрофа, 2004, - 256 с.]. Для этого в пробирке с физиологическим раствором размачивали прилипшие к корням частицы почвы, затем

25 3 раза переносили в пробирки со стерильным физиологическим раствором и 4 раза промывали в стерильной воде. Очищенные таким образом корни измельчали стерильным пинцетом и ножницами, после чего помещали в стерильную чашку Петри. Затем отбирали навеску корней массой 5 г и растирали их в стерильной фарфоровой ступке. Измельченные корни смывали в колбу с таким расчетом, чтобы объем полученной

30 суспензии составил 50 мл. В колбу добавляли 5 г кварцевого песка и встряхивали суспензию в течение 5 минут. Затем 5 мл жидкости переносили в другую колбу, содержащую 45 мл стерильной воды. Из первой колбы 5 мл суспензии добавляли во вторую колбу с 45 мл воды, из третьей - в четвертую. Таким образом, готовили 7 десятикратных разведений, которые высевали на поверхность плотных питательных

35 сред. Недостаток способа в том, что высеваются как спорообразующие, так и не спорообразующие микроорганизмы, что требует дополнительных процедур для их разделения и идентификации.

Наиболее близким аналогом-прототипом можно считать способ селективного выделения из почвы отдельных групп почвенных бактерий. Для преимущественного

40 выделения из почвы грамположительных спорообразующих бактерий проводят пастеризацию почвенных суспензий (прогревание при 80° в течение 10-15 мин), при которой погибают вегетативные клетки и сохраняются споры бактерий. Для элиминирования бацилл, при учете стрептомицетов, нокардий, коринеподобных бактерий и грамотрицательных бактерий используют добавление в питательные среды красителя

45 метилового красного (0,015%) [Зенова Г.М., П.Ф. Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н.А. / Практикум по биологии почв: Учеб. пособие - М.: Издательство МГУ, 2002. С. 36-37].

Недостатком данного способа является низкая и неоднозначная селекция, после

которой необходимо использовать дополнительные процедуры для разделения бактерий по роду.

Целью настоящего изобретения является - упрощение процесса выделения из ризопланы и ризосферы прикорневой области растений бактерий р. *Bacillus* за счет:

- 5 уменьшения времени проведения исследования;
- уменьшения количества используемых химических реактивов;
- удешевление процесса, за счет использование недорогих химических реактивов (используется один, недорогой, общедоступный реактив - серная кислота);
- упрощение выбора колоний для дальнейшей идентификации по видовым признакам,
- 10 за счет небольшого количества колоний, выросших на твердой среде.

Поставленная цель достигается тем, что корни растений совместно с прилегающими частичками почвы выдерживают в серной кислоте с концентрацией от 75% до 96% в течение 1,5-3 минут, после чего 0,1 мл пробы высевают в чашки Петри на твердую питательную среду, культивируют при 37°C в течение не менее 24 часов для роста

15 колоний.
Выросшие колонии - бактерии р. *Bacillus* - используют для дальнейшей идентификации видовых признаков и используют по назначению.

Пример. В стерильную колбу объемом 100 мл помещают 50 мл серной кислоты с концентрацией от 96% до 25%. Приготовление различных концентраций серной кислоты

20 осуществляют по стандартным методикам, с учетом плотности кислоты (Справочник химика 21. Электронный ресурс: режим доступа: www.chem21.info. Дата доступа: 04.05.2019). Затем охлаждают выстаиванием до комнатной температуры ($t=20-25^{\circ}\text{C}$) и помещают в колбу измельченные стерильными ножницами до 2-3 см части корней растений с прилипшими частицами почвы. Затем однократно перемешивают стерильной

25 стеклянной палочкой, выдерживают 1,5-10 минут и производят посев 0,1 мл пробы стерильной пипеткой на чашки Петри с L-агаром следующего состава (г/л): агар-агар - 18, дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, дистиллированная вода -

до 1 л (рН 6,8-7,0). Стерилизация среды при 1.1 кгс/см² 40 минут. Пробу равномерно распределяют по поверхности среды стерильным шпателем Дригальского и

30 культивируют в термостате в течение 24 часов при температуре 37°C. В чашках наблюдают рост колоний. Далее отбирают изолированные колонии для видовой идентификации.

Идентификацию ризобактерий осуществляли по морфологическим, тинкториальным, биохимическим свойствам с помощью:

- 35 - Хоулт Дж. Криг Н. Определитель бактерий Берджи, в 2 томах. Том 1. Москва. Издательство "Мир", 1997;
- Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). - 1973. - V. 1. - P. 71-88;
- 40 - Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. - Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013, - 98 с.

Морфологические и тинкториальные свойства выделенных штаммов микроорганизмов изучали с помощью биологического микроскопа марки Биомед 5.

Идентификацию ризобактерий осуществляли по следующим методикам с

45 использованием указанных питательных сред и реактивов.

Окраска по методу Грама:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги и на него наносят карболовый раствор генцианового фиолетового. Окрашивание проводят на

протяжении 1-2 мин.

2. Бумажку снимают, краситель сливают и, не промывая препарат водой, обрабатывают его на протяжении 1-2 мин раствором Люголя до почернения.

3. Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96%-ным этиловым спиртом (препарат несколько раз помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек). Обесцвечивание проводят не более 30 с.

4. Препарат промывают водой.

5. Мазок дополнительно окрашивают на протяжении 1-2 мин водным раствором фуксина.

10 6. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой. Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные - в розовый.

Реактивы для окраски по Граму:

15 1. Карболовый раствор генциана фиолетового: 1 г генциана фиолетового, 10 мл ректификованного этилового спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды. В ступке растереть краситель с карболовой кислотой до получения кашицеобразной массы, прибавить небольшими порциями спирт и развести водой. Слить раствор в бутылку, поместить в термостат до растворения, профильтровать.

20 2. Раствор Люголя: 1 г йода кристаллического, 2 г йодистого калия растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Смесь поместить в бутылку матового стекла, хорошо закупорить и поставить на сутки в термостат, после чего добавить 300 мл дистиллированной воды. Хранить во флаконе из темного стекла.

25 3. Фуксин Циля: к 10 мл, насыщенного спиртового раствора основного фуксина прилить 90 мл 5% раствора карболовой кислоты. Карболовую кислоту влить в краситель, а не наоборот. Каждый краситель фильтруют не менее 2-х раз.

Тест Грегерсена:

Для работы используется 3%-ный раствор КОН.

30 На предметное стекло наносят каплю реактива, в которую стерильной бактериологической петлей вносят исследуемую чистую культуру бактерий. Тщательно перемешивают в течение 30 с и определяют вязкость полученной суспензии. При образовании вязких слизистых тянущихся нитей исследуемые клетки относят к грамотрицательным. Если вязкость суспензии не изменилась, то клетки являются грамположительными (Микробиология. Практикум: пособие / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. - Минск: БГУ, 2015, - стр. 33-34).

35 40 Выявление каталазы проводят на предметном стекле в капле 3%-ного раствора перекиси водорода. Стерильной бактериологической петлей в каплю перекиси вносят исследуемую культуру и тщательно перемешивают. При наличии каталазы происходит разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода (Микробиология. Практикум: пособие / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина. - Минск: БГУ, 2015, - стр. 51).

Использовались готовые питательные среды МПА и МПБ. При посеве на МПА и МПБ использовали стандартные методы посева на плотные и жидкие питательные среды, бактерии культивировали при 37°C в течение 24 часов.

Таблица 1. Рост колоний на L-агаре в зависимости от концентрации серной кислоты и времени.

Время, мин	Концентрация серной кислоты, %							
	96	85	75	65	55	45	35	25
5	Крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве от 1-5. Выбор колоний оптимален.	Крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве от 1-5. Выбор колоний оптимален.	Крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве от 1-5. Выбор колоний оптимален.	Менее крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве до 20, зоны сливного роста. Выбор колоний затруднен.	Менее крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве до 20, зоны сливного роста. Выбор колоний затруднен.	Колонии многочисленные, присутствуют зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.	Равномерный сплошной рост. Выбор единичных колоний не возможен.	Равномерный сплошной рост. Выбор единичных колоний не возможен.
10	Крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве от 1-5. Выбор колоний оптимален.	Крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве от 1-5. Выбор колоний оптимален.	Крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве от 1-5. Выбор колоний оптимален.	Менее крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве до 20, зоны «сливного» роста. Выбор колоний затруднен.	Менее крупные изолированные (одиночные) колонии в количестве до 20, зоны «сливного» роста. Выбор колоний затруднен.	Колонии многочисленные, присутствуют зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.	Равномерный сплошной рост. Выбор единичных колоний не возможен.	Равномерный сплошной рост. Выбор единичных колоний не возможен.
15	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии в количестве до 20, зоны сливного роста. Выбор колоний затруднен.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии в количестве до 20, зоны сливного роста. Выбор колоний затруднен.	Колонии многочисленные, присутствуют зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.	Равномерный сплошной рост. Выбор единичных колоний не возможен.	Равномерный сплошной рост. Выбор единичных колоний не возможен.
20				затруднен.				
25	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Изолированные колонии в количестве до 20, зоны сливного роста. Выбор колоний затруднен.	Изолированные колонии в количестве до 20, зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.	Колонии многочисленные, присутствуют зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.	Колонии многочисленные, присутствуют зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.
30	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Менее крупные, изолированные (одиночные) колонии, в количестве от 1-5.	Изолированные колонии в количестве до 20, зоны «сливного» роста. Выбор колоний затруднен.	Колонии многочисленные, присутствуют зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.	Колонии многочисленные, присутствуют зоны «сливного роста». Выбор колоний затруднен.

Таким образом, оптимальной является концентрация серной кислоты от 75 до 96%, т.к. при этой концентрации вырастают единичные крупные изолированные колонии, что делает их выборку (извлечение) и оценку морфологических свойств оптимальной. Минимальное время эксперимента, при котором вырастают изолированные колонии - 1,5-3 минуты.

Результаты идентификации колоний, выросших на питательных средах:

1. При росте на L-агаре - колонии средние и крупные. Максимальный диаметр составлял 0,7-1,2 см. Колонии округлой формы, серовато-белого цвета, матовые, бархатистые, с неровным краем. Все колонии сухие, не врастают в агар и легко отделяются от него.

2. Рост на МПА - колонии белые, серые, иногда желтые, морщинистые, твердые, восковидные, круглые или ползущие на стенку чашки.

3. Рост на МПБ - наблюдается помутнение среды, изредка образуется осадок.

4. Все штаммы грамположительные.

5. Прямые или почти прямые палочки, расположены одиночно, по две клетки или в коротких цепочках.

6. Образуют овальные споры, расположенные термально или субтермально.

7. Все штаммы подтвердили отрицательные реакцию Грегersonа.

8. Все штаммы подтвердили положительную реакцию на каталазу.

Все эти признаки подтверждают принадлежность выделенных штаммов к роду
5 *Bacillus*. (Хоулт Дж. Криг Н. Определитель бактерий Берджи, в 2 томах. Том 1. Москва. Издательство "Мир", 1997; Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). - 1973. - V. 1. - P. 71-88; Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. - Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А.
10 Столыпина, 2013, - 98 с.).

(57) Формула изобретения

Способ выделения бактерий р. *Bacillus* из ризопланы и ризосферы прикорневой зоны растений, отличающийся тем, что измельченные корни растений совместно с
15 прилегающими частичками почвы помещают в серную кислоту с концентрацией от 75% до 96% и температурой $t=20-25^{\circ}\text{C}$, выдерживают в течение 1,5-3 мин, после чего 0,1 мл пробы высевают в чашки Петри на L-агар и культивируют при 37°C в течение 24 ч.

20

25

30

35

40

45