



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2019.08); C12R 1/125 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019135733, 06.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.11.2019

Дата регистрации:
26.05.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.11.2019

(45) Опубликовано: 26.05.2020 Бюл. № 15

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Яценко Елена Сергеевна (RU),
Затонская Лина Викторовна (RU),
Лыков Павел Викторович (RU),
Петухов Виктор Анатольевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: RU 2680702 C1, 25.02.2019. RU
2668173 C1, 26.09.2018. RU 2678133 C1,
23.01.2019. RU 2105562 C1, 14.06.1995.

(54) Питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для культивирования бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079. Питательная среда для культивирования бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 содержит пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, горох шлифованный,

предварительно обработанный автоклавированием, карбонат кальция, фосфат калия и дистиллированную воду при заданном соотношении компонентов. Изобретение позволяет повысить выход биомассы бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079. 6 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/20 (2019.08); C12R 1/125 (2019.08)(21)(22) Application: **2019135733, 06.11.2019**(24) Effective date for property rights:
06.11.2019Registration date:
26.05.2020

Priority:

(22) Date of filing: **06.11.2019**(45) Date of publication: **26.05.2020 Bull. № 15**

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPPTUIS**

(72) Inventor(s):

**Yatsenko Elena Sergeevna (RU),
Zatonskaya Lina Viktorovna (RU),
Lykov Pavel Viktorovich (RU),
Petukhov Viktor Anatolevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**(54) **NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF BACILLUS SUBTILIS VKPM B-12079**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to biotechnology and can be used for cultivation of *Bacillus subtilis* VKPM B-12079 bacteria. Nutrient medium for cultivation of *Bacillus subtilis* VKPM B-12079 bacteria contains fermentative peptone, yeast

extract, sodium chloride, grinded peas pre-treated with autoclave, calcium carbonate, potassium phosphate and distilled water at the specified components ratio.

EFFECT: invention allows to increase the yield of biomass of *Bacillus subtilis* VKPM B-12079 bacteria.

1 cl, 6 tbl, 4 ex

Настоящее изобретение относится к биотехнологии, микробиологии, и может быть использовано для культивирования бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, который составляет основу кормовой добавки «Энзимспорин».

5 Определенный набор питательных веществ необходим микроорганизмам для проявления их полезных свойств [1]. Для получения полноценного питания (азотистые соединения, углеводы, микро- и макроэлементы, другие биологически активные вещества) необходимо, на основании индивидуальных особенностей микроорганизмов, проводить исследования по подбору состава питательных сред [2]. Для повышения биологической активности микроорганизмов в настоящее время все чаще используют
10 дешевые питательные среды, на их основе разрабатывают более совершенные технологии с целью значительного повышения продуктивности бактериальных культур. В состав питательной среды входят различные компоненты.

Неорганические соли используются в питательных средах как дополнительный источник N, P, O, S, H. Микроорганизмы лучше усваивают азот в восстановленной
15 форме, остальные элементы - в окисленной форме. В качестве источника азота используют горох шлифованный по ГОСТ 6201-68. Однако, данных по использованию гороха шлифованного для приготовления сред для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 не найдено.

Для оптимизации питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-
20 12079, были выбраны следующие неорганические соли: фосфат калия и карбонат кальция и горох шлифованный.

Известна питательная среда [3] для культивирования *Bacillus subtilis* следующего состава (г/л):

фосфат калия однозамещенный - 0,2-0,4;
25 сульфат аммония - 1.0-3.0;
цитрат натрия - 1.0-3.0;
сернокислая медь - 0.001-0.01;
сернокислый цинк - 0.002-0.005;
сернокислое железо - 0.0001-0.001;
30 хлористый кальций - 0.09-0.2;
сернокислый магний - 0.1-0.5;
сернокислый марганец - 0.01-0.1;
пептон - 2.0-8.0;
мальтоза - 1.0-5.0;
35 вода - остальное

Недостатком данной среды является многокомпонентность.

Известна аналогичная питательная среда [4] для культивирования *Bacillus subtilis* следующего состава (г/л):

1. Пептон - 12.0;
40 2. Дрожжевой экстракт - 5.0;
3. Натрий хлористый - 5.0;
4. Вода водопроводная до 1 л;
5. Канамицин - 50 мг/л;
6. Агар-Агар - 20.0;
45 7. Вода водопроводная до 1 л

Питательную среду формируют в емкости в виде слоя, на который укладывают полупроницаемую мембрану, например, целлофановую пленку. Сверху на пленку наносят посевную дозу штамма бактерий. Культивирование осуществляют в термостате

при температуре 34-37°C в течение 20-24 ч. Далее емкость переносят в термостат с температурой 6-10°C и выдерживают при этой температуре в течение суток до образования спор бактерий.

Недостатком данной среды является то, что в состав среды входит канамицин - антибиотический препарат группы аминогликозидов. Для его приобретения требуется оформление разрешающих документов. Так же используется трудоемкая технология посева микроорганизмов.

Таблица 1. Известна аналогичная питательная среда, следующего состава:

Компонент питательной среды	Масса вещества, содержащаяся в 1 л жидкой среды, г	Масса вещества, содержащаяся в 1 л плотной среды, г
Пептон	15	15
Дрожжевой экстракт	5	5
Хлорид натрия	5	5
Агар-агар	0	18
Вода водопроводная	до 1 л	до 1 л

Недостатком данной среды является то, что, пересев культуры на твердой среде нужно осуществлять каждые 15, максимум 30 дней. Это требует затрат сред, реактивов, энергоресурсов и рабочего времени.

Целью предлагаемого изобретения является увеличение количества бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 и срока хранения культуры на твердой среде, посредством культивирования на жидкой и твердой (агаризованной) питательной среде. Поставленная цель достигается тем, что в питательную среду, содержащую питательную основу и дистиллированную воду, вносится несколько неорганических солей (карбонат кальция и фосфат калия) и горох шлифованный, предварительно обработанный.

В качестве исходного штамма использовали штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, который представляет собой светло-коричневый сухой порошок из лиофильно высушенных бактерий штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079. Содержание спор составляет 5×10^9 КОЕ/г. Навеску спор взвешивали в стерильных условиях на аналитических весах, погрешность которых составляет 0,0002 г.

Из спор готовили суспензию в колбу Эрленмейера объемом 50 мл, содержащую жидкую питательную среду, которую готовят при следующем соотношении компонентов (г/л): пептон ферментативный - 15, дрожжевой экстракт - 5, натрий хлористый - 5, горох шлифованный, предварительно обработанный, в различных количествах, неорганическая соль в различных количествах (см. таблица 2), остальное - дистиллированная вода.

Для использования гороха шлифованного требуется его предварительная обработка. Горох шлифованный, в количестве 100 г/л промыть водопроводной водой, поместить во флакон емкостью 1 литр, и довести до литра дистиллированной водой. Закрывать флакон пробкой герметично. Затем автоклавировать в течении 1 часа при 2 Bar. После автоклавирования остудить до комнатной температуры и дважды процедить через два слоя марли. Полученный после обработки горох соединить с остальными компонентами среды и довести до 1 л дистиллированной водой. Значение pH 7,0-7,2. Стерилизация при 1,1 атм. в течение 45 мин. Полученная среда имеет светло-желтый цвет, «чистый» запах и незначительный осадок. Охлаждали до комнатной температуры.

Затем вносили 5 г спор. Микроорганизмы (штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079) выращивали в колбах с жидкой средой в шейкер-инкубаторе «Innova 44» при 250 об/

мин (эксцентриситет 5 см) и температуре 37°C в течение 24 часов. Такие условия являются оптимальными для *Bacillus subtilis*. Для сохранения посевного материала и подсчета колоний, после культивирования на жидкой среде, осуществляли посев на твердую питательную среду, которую готовили при следующем соотношении компонентов:

пептон ферментативный - 15, дрожжевой экстракт - 5, натрий хлористый - 5, горох шлифованный, предварительно обработанный, в различных количествах, неорганическая соль в различных количествах (см таблица 1), агар - 18, остальное - дистиллированная вода. Значение pH 7,0-7,2. Стерилизация при 1,1 атм. в течение 40 мин. инкубированные производиться 24 ч, температура 37°C в термостате. Затем осуществляли хранение посевного материала в течение 3-5 месяцев при температуре + 4-8°C.

Для выявления количества микроорганизмов использовали стандартный метод десятикратных разведений, с высевом в стерильных условиях в чашки Петри на твердую питательную среду,

После чего чашки с посевами инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. В качестве контрольной пробы проводилось культивирование на средах без добавления солей и гороха шлифованного, предварительно обработанного. Для достоверности все опыты были проведены в семикратной повторности. Для культивирования использовали питательные среды (табл. 2).

Таблица 2. Состав жидкой и твердой питательных сред

Компонент питательной среды	Масса вещества, содержащаяся в 1 л жидкой среды, г	Масса вещества, содержащаяся в 1 л плотной среды, г
Пептон	15.0	15.0
Дрожжевой экстракт	5.0	5.0
Хлорид натрия	5.0	5.0
Агар-агар	—	18.0
Горох шлифованный, предварительно обработанный автоклавированием	10, 30, 50, 100 мл	10, 30, 50, 100 мл
Неорганические соли	0.10; 0.15; 0.25; 0.50; 1.00; 1.50	0.10; 0.15; 0.25; 0.50; 1.00; 1.50
Вода дистиллированная	до 1 л	до 1 л

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Влияние фосфата калия (K_3PO_4).

Данные культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 на средах, содержащих различные концентрации фосфата калия, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 в среде, содержащей фосфата калия

№ пробы	Концентрация соли в пробе, г/л	КОЕ/г·10 ⁻¹²
1	0,10	249±10
2	0,15	252±10
3	0,25	260±10
4	0.50	274±10
5	1,00	279±10
6	1,5	272±10
7	0	240±10

Из приведенных данных видно, что максимальный достоверный рост количества колоний *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 наблюдался в средах с содержанием фосфата калия 0,50 г/л соли. Дальнейшее увеличение концентрации не меняет численность микроорганизмов. Для удешевления среды используем минимальную концентрацию соли, которая дает увеличение численности. Добавление фосфата калия в концентрации 0,5 г/л достоверно увеличивает количество микроорганизмов относительно контроля.

Пример 2. Влияние карбоната кальция (CaCO₃).

Данные культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 на средах, содержащих карбонат кальция, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Данные культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 в среде, содержащей карбонат кальция

№ пробы	Содержание соли в пробе, г/л	КОЕ/г·10 ⁻¹²
1	0,1	240±10
2	0,15	240±10
3	0,25	240±10
4	0,5	240±10
5	1,00	264±10
6	1,5	270±10
7	0	240±10

Добавление карбоната кальция в питательную среду в концентрации 1,0 г/л достоверно увеличивает количество микроорганизмов относительно контроля.

Пример 3. Влияние гороха шлифованного, предварительно обработанного.

Данные культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 в среде, содержащей, горох шлифованный, предварительно обработанный представлены в таблице 5.

Таблица 5. Данные культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 в среде, содержащей горох шлифованный, предварительно обработанный

№ пробы	Содержание гороха шлифованного, предварительно обработанного, мл/л	КОЕ/г·10 ⁻¹²	Жидкая среда	Твердая среда
1	10	246±10	Прозрачная, небольшой осадок	Прозрачная
2	30	286±10	Прозрачная, небольшой осадок	Прозрачная
3	50	298±10	Мутная, становится прозрачной после осаждения, много осадка	Мутная, подсчет колоний не затруднен
4	100	307±10	Мутная, становится прозрачной после осаждения, много осадка	Мутная, подсчет колоний затруднен
5	200	321±10	Мутная, становится прозрачной после осаждения, много осадка	Мутная, подсчет колоний затруднен
6	0	240±10	Прозрачная. Без осадка	Прозрачная

При концентрации гороха шлифованного, предварительно обработанного в питательной среде 50 мл/л, наблюдалось увеличение количества колоний *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079. При дальнейшем увеличении концентрации численность колоний увеличивается, но твердая среда становится мутной от осадка гороха, что делает затруднительным просмотр колоний на среде. Таким образом, 50 мл/л является оптимальной концентрацией для работы со средой.

Пример 4. Влияние гороха шлифованного, предварительно обработанного, фосфата калия и карбоната кальция на численность микроорганизмов в процессе культивирования

Были выбраны концентрации выше перечисленных ингредиентов, которые максимально увеличивают численность бактерии и качество среды. Таким образом, увеличение количества *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 достигается внесением в питательную среду: 50 мл / гороха шлифованного, предварительно обработанного; 1,0 г/л карбоната кальция; 0,5 г/л фосфата калия. Наблюдаем синергетический эффект взаимодействия компонентов (табл. 6).

Таблица 6. Увеличение КОЕ в пробе, по сравнению с контрольной пробой

Исходная питательная среда, КОЕ/г·10 ⁻¹²	Питательная среда с добавлением гороха шлифованного, карбоната кальция и фосфата калия, КОЕ/г·10 ⁻¹²
240±10	310±10

Хранение посевного материала на среде с добавлением гороха шлифованного, предварительно обработанного, карбоната кальция и фосфата калия возможно в течение 3-4 месяца при температуре +4-8°C.

Литература

Биотехнология. Под ред. А.А. Баева. М.: Наука, 1984. 309 с.

1. White A., Handler P., Smith E.L. Principles of biochemistry. Baltimore: The Johns Hopkins University School of Medicine, 1974. 1051 p.

2. Лемяк А.И., Костровский В.Г., Рязанкина О.И. и др. Способ получения бактериального препарата на основе *Bacillus subtilis* // Патент РФ №2105562, заявлено 14.06.1995, опубл. 27.02.1998.

(57) Формула изобретения

Питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, содержащая пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, дистиллированную воду, агар-агар для твердой питательной среды, отличающаяся тем, что дополнительно содержит горох шлифованный, предварительно обработанный автоклавированием, карбонат кальция и фосфат калия при следующем соотношении компонентов, г/л:

пептон	15,0
дрожжевой экстракт	5,0
хлорид натрия	5,0
агар-агар для твердой питательной среды	18,0
горох шлифованный, предварительно обработанный автоклавированием	50 мл
карбонат кальция	1,0
фосфат калия	0,5
вода дистиллированная	до 1 л