



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2023.01); C12Q 1/04 (2023.01); C12R 2001/01 (2023.01)

(21)(22) Заявка: 2022117391, 27.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.06.2022

Дата регистрации:
11.05.2023

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 27.06.2022

(45) Опубликовано: 11.05.2023 Бюл. № 14

Адрес для переписки:
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
"Алтайский государственный университет",
ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Яценко Елена Сергеевна (RU),
Лейтес Елена Анатольевна (RU),
Петухов Виктор Анатольевич (RU),
Ермакова Алена Вячеславовна (RU),
Потапкина Юлия Александровна (RU),
Красникова Светлана Игоревна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2722071 C1, 26.05.2020. RU
2678133 C1, 23.01.2019. RU 2668178 C1,
26.09.2018. KING E.O., et al., Two simple media
for the demonstration of pyocyanin and
fluorescein, J. Lab and Clin. Med., 1954, Vol. 44(2),
p. 301-307.

(54) Универсальная питательная среда для культивирования микроорганизмов

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложена питательная среда для культивирования *Pseudomonas fluorescens* AP-33, *Bacillus subtilis* B-12079, *Bacillus subtilis* B-2896 или *Azotobacter chroococcum*. Среда содержит исходные компоненты, г/л: меласса 10, фосфат калия 2,5, сульфат магния 1, сульфат железа (III) 1, нитрат аммония 1, суспензия, полученная путем смешивания 80 г шлифованного гороха с водой, доведенной до литра, варкой смеси в течение 30

минут и настаиванием в течение одного часа, с последующим охлаждением до комнатной температуры и процеживанием дважды через два слоя марли, дистиллированная вода до литра. Изобретение позволяет оптимизировать технологический процесс производства биотехнологических препаратов, где в составе находятся микроорганизмы разных таксономических групп. 3 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/20 (2023.01); C12Q 1/04 (2023.01); C12R 2001/01 (2023.01)

(21)(22) Application: **2022117391, 27.06.2022**

(24) Effective date for property rights:
27.06.2022

Registration date:
11.05.2023

Priority:

(22) Date of filing: **27.06.2022**

(45) Date of publication: **11.05.2023** Bull. № 14

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

(72) Inventor(s):

**Yatsenko Elena Sergeevna (RU),
Lejtes Elena Anatolevna (RU),
Petukhov Viktor Anatolevich (RU),
Ermakova Alena Vyacheslavovna (RU),
Potapkina Yuliya Aleksandrovna (RU),
Krasnikova Svetlana Igorevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **UNIVERSAL NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATING MICROORGANISMS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: nutrient medium for cultivation of *Pseudomonas fluorescens* AP-33, *Bacillus subtilis* B-12079, *Bacillus subtilis* B-2896 or *Azotobacter chroococcum* is proposed. The medium contains the following initial components, g/l: molasses 10, potassium phosphate 2.5, magnesium sulfate 1, iron (III) sulfate 1, ammonium nitrate 1, suspension obtained by mixing 80 g of polished peas with water, brought to

a liter, by boiling mixture for 30 minutes and infusion for one hour, followed by cooling to room temperature and filtering twice through two layers of gauze, distilled water to a liter.

EFFECT: invention allows optimizing the technological process for the production of biotechnological preparations, which contain microorganisms of different taxonomic groups.

1 cl, 3 tbl, 3 ex

RU 2 795 797 C1

RU 2 795 797 C1

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, микробиологии, а также к сельскому хозяйству и может быть использовано для получения высокоэффективных препаратов - средств защиты растений.

5 Современными средствами защиты растений - это консорциумы микроорганизмов. Культивирование каждого штамма на определенной питательной среде - процесс трудоемкий и дорогостоящий.

Известна питательная среда для культивирования *Pseudomonas fluorescens* AP-33, состоящая из следующих компонентов, при их соотношении, г/л:

10 Меласса 15, Калий фосфорнокислый двузамещенный трехводный 0,5, Сульфат магния семиводный 0,2, Горох шлифованный, предварительно обработанный автоклавированием 250, Янтарная кислота 0,05, Лапзол или агар соответственно 5 или 18, Дистиллированная вода до 1 л [1]. Данная среда не предназначена для культивирования *Bacillus subtilis* и *Azotobacter chroococcum*.

15 Известна питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* L-бульон. Его готовят следующим образом: состав (г/л): дрожжевой экстракт - 5, пептон ферментативный - 15, хлорид натрия - 5, дистиллированная вода - до 1 л (рН 6,8-7,0). Стерилизацию проводили при давлении 1,1 атм. в течение 40 минут [2].

Недостатком данной среды является то, что при культивировании *Bacillus subtilis* 20 ВКПМ В-12079 максимальное количество организмов не выше 5×10^9 КОЕ/мл. Не предназначена для культивирования *Pseudomonas fluorescens* AP-33 и *Azotobacter chroococcum*.

Известна питательная среда для культивирования *Azotobacter chroococcum*: горох (отвар) - 100,0 мл; глюкоза - 10,0 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0 г; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г; K_2HPO_4 - 0,5 25 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г; CaCO_3 - 1,0 г, затем изготовление рабочей культуры на среде, содержащей (г/л): глюкоза - 20,0; кукурузный экстракт - 10,0; дрожжевой экстракт - 0,25; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,5; K_2HPO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; CaCO_3 - 1,0 [3].

Недостатком среды является многокомпонентный состав, не предназначена для 30 культивирования *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*.

Целью настоящего исследования является создание недорогой универсальной питательной среды для культивирования микроорганизмов различных таксономических групп, на примере *Pseudomonas fluorescens* AP-33 *Bacillus subtilis* 27 D, *Bacillus subtilis* В-12079, *Bacillus subtilis* В-2896, *Azotobacter chroococcum*. Предлагаемая питательная среда, 35 способствует оптимизации технологического процесса и удешевлению готового продукта, когда в одном препарате используются консорциум микроорганизмов.

Сущность технического решения поясняется следующим.

Технология приготовления питательной среды

Для использования гороха шлифованного требуется его предварительная обработка. 40 Горох шлифованный, в количестве 80 г промыть водопроводной водой, поместить в емкость, и довести до литра водой. Затем варить на плите 30 минут и настаивать 1 час. После приготовления остудить до комнатной температуры и дважды процедить через два слоя марли. Полученную суспензию соединить с компонентами (г/л): меласса 10, фосфат калия 2,5, сульфат магния 1, сульфат железа(III) 1, нитрат аммония 1 довести 45 до 1 л дистиллированной водой. Значение рН должно соответствовать 7,5-7,6 ед. рН. Затем стерилизовать в автоклаве 30 минут 1,0 Bar. Полученная среда имеет светло-желтый цвет, «чистый» запах и незначительный осадок. Культивирование микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* AP-33 *Bacillus subtilis* 27 D, *Bacillus subtilis* В-

12079, *Bacillus subtilis* В-2896 производится 20-24 часа, температура - $30 \pm 2^\circ\text{C}$, принудительная аэрация со скоростью вращения 125 об/мин, культивирование *Azotobacter chroococcum* через 72 часа без принудительной аэрации.

Контроль за численностью микроорганизмов осуществляют стандартным методом десятикратных разведений.

Пример 1. Сравнение результатов культивирования на питательных средах *Pseudomonas fluorescens* AP-33

Таблица 1. Результаты культивирования на питательных средах *Pseudomonas fluorescens* AP-33

	Питательная среда	КОЕ/мл * 10^{-10}
1	Известная питательная среда [1]	10 ± 3
2	Предлагаемая питательная среда	40 ± 10

Из таблицы 1 видно, что численность *Pseudomonas fluorescens* AP-33 на исследуемой питательной среде выше.

Пример 2. Сравнение результатов культивирования на питательных средах *Bacillus subtilis* 27 D, *Bacillus subtilis* В-12079, *Bacillus subtilis* В-2896

Таблица 2. Сравнение результатов культивирования на питательных средах *Bacillus subtilis* 27 D, *Bacillus subtilis* В-12079, *Bacillus subtilis* В-2896

	Питательная среда	КОЕ/мл * 10^{-9}
1	Известная питательная среда для культивирования <i>Bacillus subtilis</i> [2]	5 ± 2
2	Предлагаемая питательная среда, <i>Bacillus subtilis</i> 27 D	5 ± 2
3	Предлагаемая питательная среда, <i>Bacillus subtilis</i> В-12079	15 ± 5
4	Предлагаемая питательная среда, <i>Bacillus subtilis</i> В-2896	4 ± 2

Из таблицы 2 видно, что численность микроорганизмов, *Bacillus subtilis* 27 D и *Bacillus subtilis* В-2896 сопоставим с ростом на L-бульоне, а численность *Bacillus subtilis* В-12079 выше.

Пример 3. Сравнение результатов культивирования на питательных средах *Azotobacter chroococcum*

Таблица 3. Сравнение результатов культивирования на питательных средах *Azotobacter chroococcum*

	Питательная среда	КОЕ/мл * 10^{-4}
1	Известная питательная среда [3]	10 ± 3
2	Предлагаемая питательная среда	15 ± 5

Из таблицы 3 видно, что численность *Azotobacter chroococcum* на исследуемой питательной среде выше.

Таким образом, предлагаемая питательная среда для культивирования различных штаммов бактерии *Pseudomonas fluorescens* AP-33, *Bacillus subtilis* 27 D, *Bacillus subtilis* В-12079, *Bacillus subtilis* В-2896, *Azotobacter chroococcum* универсальна, содержит не дорогое и доступное сырье, малокомпетентная, проста в приготовлении, не требует дополнительного оборудования для культивирования (нет необходимости темостатировать культуры) что позволяет оптимизировать технологический процесс.

Список литературы

10 1. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* AP-33 Яценко Е.С., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю., Бойко С.С., Дурникин Д.А. Патент на изобретение RU 2678133 C1, 23.01.2019.

15 2. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *BACILLUS SUBTILIS*. Рыженков Н.С., Яценко Е.С., Микушина И.В., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю. Патент на изобретение RU 2668178 C1, 26.09.2018.

3. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе (Методические рекомендации), Ленинград, 1991.

20 (57) Формула изобретения

Универсальная питательная среда для культивирования микроорганизмов разных таксономических групп *Pseudomonas fluorescens* AP-33, *Bacillus subtilis* В-12079, *Bacillus subtilis* В-2896 или *Azotobacter chroococcum*, содержащая мелассу, фосфат калия, сульфат магния, сульфат железа (III), нитрат аммония, суспензию, полученную путем смешивания 25 80 г шлифованного гороха с водой, доведенной до литра, варкой смеси в течение 30 минут и настаиванием в течение одного часа с последующим охлаждением до комнатной температуры и процеживанием дважды через два слоя марли, и дистиллированную воду при заданных соотношениях исходных компонентов, г/л:

30 меласса 10, фосфат калия 2,5, сульфат магния 1, сульфат железа (III) 1, нитрат аммония 1, суспензия, полученная путем смешивания 80 г шлифованного гороха с водой, доведенной до литра, варкой смеси в течение 30 минут и настаиванием в течение одного часа с последующим охлаждением до комнатной температуры и процеживанием дважды через два слоя марли, дистиллированная вода до 1 л.

35

40

45