



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C02F 1/48 (2021.05); C02F 1/50 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2020133688, 13.10.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.10.2020

Дата регистрации:
17.09.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 13.10.2020

(45) Опубликовано: 17.09.2021 Бюл. № 26

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)

(73) Патентообладатель(и):
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: С.С. БОЙКО и др. Влияние
ультразвука на численность *Bacillus subtilis* в
процессе стационарного культивирования //
статья в сборнике трудов конференции :
Технологии и оборудование химической,
биотехнологической и пищевой
промышленности, Бийск, 24-26 мая 2017 года.
GISELA ARAYA et al. Inhibition of *Escherichia*
coli and *Bacillus subtilis* FtsZ (см. прод.)

(54) Нереагентный способ подавления развития бактерий *Bacillus subtilis*

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для изменения активности бактерий в среде размножения. Способ снижения активности бактерий *Bacillus subtilis* в среде размножения, заключающийся в использовании воды, на которую воздействовали высокочастотным полем, частотой от 30 до 230 МГц в течение 90 минут, при следующем составе сред: вегетативная

среда, г/л: дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, вода-до 1 л, рН 6,8-7,0; агаризованная среда, г/л: агар-агар - 18, дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, вода - до 1 л, рН 6,8-7,0. Вышеописанный способ эффективно снижает активность бактерий *Bacillus subtilis* в среде размножения. 1 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

Polymerization and *Bacillus subtilis* Growth by Dihydroxynaphtyl Aryl Ketones //Front. Microbiol., 12 June 2019.
Б.П. ШИПУНОВ и др. Влияние высокочастотного электромагнитного поля на мутацию водных растворов глюкозы и фруктозы // Химия растительного сырья. 2019, N3, с. 235-240. RU 2668180 C1, 26.0.2018..



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 755 615** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C02F 1/48 (2006.01)
C02F 1/50 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C02F 1/48 (2021.05); C02F 1/50 (2021.05)

(21)(22) Application: **2020133688, 13.10.2020**

(24) Effective date for property rights:
13.10.2020

Registration date:
17.09.2021

Priority:

(22) Date of filing: **13.10.2020**(45) Date of publication: **17.09.2021** Bull. № 26

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)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) NON-REAGENT METHOD FOR SUPPRESSING THE DEVELOPMENT OF THE BACILLUS SUBTILIS BACTERIA

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology and can be used to change the activity of bacteria in the reproduction medium. A method for reducing the activity of the Bacillus subtilis bacteria in the reproduction medium, consisting in using water impacted by a high-frequency field with a frequency of 30 to 230 MHz for 90 minutes, at the following composition of media: vegetative medium, g/l: yeast

extract - 5, peptone - 15, sodium chloride - 5, water - up to 1 l, pH of 6.8 to 7.0; agarised medium, g/l: agar - agar - 18, yeast extract - 5, peptone - 15, sodium chloride - 5, water - up to 1 l, pH of 6.8 to 7.0.

EFFECT: above method effectively reduces the activity of Bacillus subtilis bacteria in the reproduction medium.

1 cl, 1 dwg, 3 tbl

RU 2 755 615 C1

RU 2 755 615 C1

Необходимость подавления скорости развития бактерий обусловлена их возможным негативным влиянием на различные сферы жизнедеятельности человека. Однако, в некоторых случаях требуется не полное уничтожение бактерий, а уменьшении скорости метаболизма. Это позволяет подобрать условия культивирования при определении скорости размножения бактерий.

Как правило, для снижения численности микроорганизмов используются химические вещества. Известен способ, заключающийся в подаче ортофталевого альдегида в водные системы, чувствительные к загрязнению бактериями. Ортофталевый альдегид вводят в количестве 0,5-1000 частей/млн, индивидуально или совместно с глутаровым альдегидом или формальдегидом (патент РФ №2036849, приоритет от 15.05.1992, авторы Алан Белл Тейс [US]; Джонатан Ледер [US], опубл. 09.06.1995).

Недостатком данного способа является применение реагентов, которые сложно затем полностью вывести из системы и исключить их неконтролируемое влияние.

Известен способ подавления развития бактерий (интернет ресурс: <http://www.h-flow.ru/technologii/princip-dejstviya-akvakler/>). Суть способа заключается в следующем: у некоторых бактерий (стафилококк, легионелла, кишечная палочка и пр.) на поверхности присутствует электрический заряд, поэтому они окружены несколькими слоями молекул воды, ориентированных полярно. Оболочка бактерий является полупроницаемой мембраной. Заряд на поверхности компенсируется суммой зарядов молекул воды данного слоя, а давление внутри бактерии компенсируется внутренним (осмотическим) давлением молекул воды, стремящихся проникнуть сквозь мембрану. При временной передаче этой системе электрического заряда нарушается равновесие, при этом значительно увеличивается толщина слоя молекул воды, что приводит к резкому увеличению осмотического давления внутри бактерии и разрыву мембраны. Результат - гибель бактерии. Недостатком способа является необходимость подачи воздействия на бактерию, находящуюся в некоторой среде, отсутствие технической возможности подачи электрического заряда через диэлектрическую (стеклянную) стенку сосуда, в котором, обычно проводят культивирование бактерий перед их высадкой на агаровый субстрат.

Целью изобретения является изменение активности бактерий в среде размножения в результате изменения структурной организации молекул воды в результате действия высокочастотного (ВЧ) поля. При этом реализуется возможность регулирования силы депрессивного воздействия через изменение свойств питательных сред. Питательные среды, используемые для микробиологических исследований, как правило, это питательный бульон, в котором интенсивно размножаются бактерии и агаровый субстрат, на который высевают бактерии, выращивают колонии и, на основе подсчета их количества, определяют скорость размножения бактерий в питательном бульоне.

Поставленная цель достигается тем, что перед приготовлением питательного бульона или агарового геля воду подвергают неконтактному воздействию электромагнитным полем высокой частоты в диапазоне 30-230 МГц в течение 90 минут.

Время воздействия выбрано на основе ранее проводившихся обширных исследований, где показано, что это наиболее оптимальное время изменения свойств воды и водных растворов [Кондратова Е.В., Тимирязев А.В., Шипунов Б.П. /Влияние электромагнитного поля на гомогенное равновесие в водных растворах. / Барнаул, Изд-во Алт. гос. ун-та, 2014, С. 49.]. Выбор частотного диапазона обусловлен имеющимся у авторов оборудованием.

Возможны три варианта реализации способа, которые отличаются тем, что для приготовления питательных сред либо раздельно, либо совместно используется вода,

подвергшаяся воздействию высокочастотного электромагнитного поля.

Первый вариант: приготовление бульона с использованием воды, подвергшейся полевому воздействию.

5 Второй: приготовление агарового субстрата для получения колоний бактерий с использованием воды, подвергшейся полевому воздействию.

Третий: приготовление и бульона, и агарового субстрата для получения изолированных колоний с использованием воды, подвергшейся полевому воздействию.

Примеры

Подготовка воды

10 Во всех экспериментах была использована емкостная ячейка аксиального типа, в которую помещался объект воздействия - деионизованная вода. Ячейка представляла собой цилиндрический сосуд из стекла емкостью 75 мл. По оси впаяна стеклянная трубка, в которой размещался центральный металлический электрод. Второй, снаружи, представлял собой обкладку из медной фольги. Электроды изолированы от раствора
15 стеклянными стенками сосуда (фиг. 1). Ячейка подключалась к источнику ВЧ сигнала - генератору, с помощью которого задавалась частота ВЧ поля. Измерения показали, что, в зависимости от частоты напряжение на электродах варьировалось в пределах 11-18 В.

Условия культивирования

20 В качестве исходного штамма использовали штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3057 D. Исследуемый биологический препарат представляет собой сухой порошок из лиофильно высушенных спор бактерий, количество которых составляет не менее 5×10^9 КОЕ/г (КОЕ - колоний образующие единицы).

25 Для культивирования использовали вегетативную среду (г/л): дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, вода - до 1 л (рН 6,8-7,0).

Для выращивания культуры использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар-агар - 18, дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, вода - до 1 л (рН 6,8-7,0).

30 Стерилизацию сред осуществляли при температуре 115°C, давлении 1,1 бар в течение 30 мин.

Из спор готовили суспензию. Для этого в колбу Эрленмейера емкостью 50 мл, содержащую 50 мл вегетативной среды, вносили 5 г спор. Культуру выращивали в колбах в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (NewBrunswick, США) при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C в течение 24 часов.

35 В качестве контрольной пробы проводили культивирование на средах, приготовленных с использованием деионизованной воды. Для определения количественных показателей интенсивности роста бактерий использовали метод десятикратных разведений.

40 Оценка наличия и эффективности полевого воздействия заключалась в сравнении скорости размножения бактерий в средах, приготовленных на основе воды, подвергшейся полевому воздействию (ВППВ), по сравнению со средами, которые готовились на обычной деионизованной воде.

45 Определение количества жизнеспособных клеток бактерии проводилось путем посева пробы соответствующего разведения на агаризованную среду. Для этого из каждой колбы отбирали 1 мл споровой суспензии и в асептических условиях производили разведение в 9 мл стерильного физиологического раствора. Содержимое пробирки перемешивали, и проводили следующее разведение, по аналогии с предыдущим. При проведении разведений каждый раз использовали стерильные пипетки. Для определения

КОЕ использовали такие разведения, которые обеспечивали число выросших колоний от 30 до 200. Такое число колоний позволяет достаточно точно провести их подсчет. Из каждого разведения засеивали по три чашки Петри, в которые заливали по 20 мл стерильной расплавленной и охлажденной до 40°C питательной среды. После застывания среды на ее поверхность в центр в стерильных условиях, пипеткой наносили 0,1 мл суспензии. Суспензию растирали по поверхности агаризованной среды стерильным шпателем Дригальского. Чашки с посевами помещали в термостат сверху дном и выдерживали при температуре 37°C в течение 24 часов. Затем подсчитывали количество выросших колоний. Подсчет числа колоний проводили визуально с помощью счетчика колоний Skan 100.

1. Бульон приготовлен на основе воды, подвергшейся полемому воздействию (ВППВ), а питательный агар приготовлен на основе деионизованной воды. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Условия	Частота полевого воздействия, F, МГц	Число колоний, КОЕ, $n \times 10^{-12}$
Бульон на основе ВППВ, агар на основе деионизованной воды	30	70±10
	90	50±0
	110	90±10
	170	70±10
	210	90±10
	230	90±20
Контроль: бульон и питательный агар на основе деионизованной воды	0	300± 50

Во всех экспериментах наблюдается подавление скорости размножения. Степень подавления зависит от частоты ВЧ поля.

2. Агар на основе ВППВ, бульон на основе деионизованной воды. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Условия	Частота полевого воздействия, F, МГц	Число колоний, КОЕ, $n \times 10^{-12}$
Агар на основе ВППВ, бульон на основе деионизованной воды	30	50±10
	90	100±10
	110	150±30
	170	90±10
	210	100±20

	230	210±40
5 Контроль: бульон и питательный агар на основе деионизованной воды	0	300± 50

Во всех экспериментах наблюдается подавление скорости размножения. Степень подавления зависит от частоты ВЧ поля. Наблюдается отличие в эффективности подавления активности в сравнении с табл. 1.

3. И бульон, и питательный агар на основе ВППВ. Результаты в таблице 3.

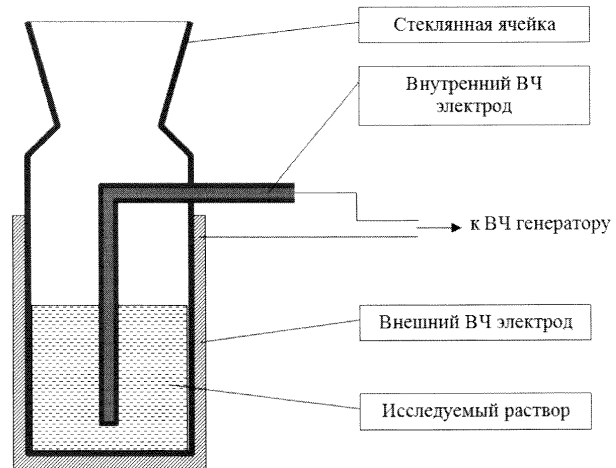
Таблица 3.

15 Условия	Частота полевого воздействия, МГц	Число колоний, КОЕ, $n \times 10^{-12}$
20 И бульон, и питательный агар на основе ВППВ	30	50±10
	90	90±10
	110	120±30
	170	100±30
	210	90±10
	230	180±30
25 Контроль: бульон и питательный агар на основе деионизованной воды	0	300± 50
30		

Во всех экспериментах наблюдается подавление скорости размножения. Степень подавления зависит от частоты ВЧ поля и не совпадает с данными табл. 1 и 2.

(57) Формула изобретения

35
Способ снижения активности бактерий *Bacillus subtilis* в среде размножения, заключающийся в использовании воды, на которую воздействовали высокочастотным полем, частотой от 30 до 230 МГц в течение 90 минут, при следующем составе сред: вегетативная среда, г/л: дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, вода - до 1 л, рН 6,8-7,0; агаризованная среда, г/л: агар-агар - 18, дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, вода - до 1 л, рН 6,8-7,0.



Фиг. 1. Конструкция ВЧ ячейки.