



(51) МПК  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12Q 1/06* (2006.01)  
*C12M 1/42* (2006.01)  
*C12R 1/125* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*C12N 3/00* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01); *C12M 1/42* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017144488, 18.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 18.12.2017

Дата регистрации:  
 26.09.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.12.2017

(45) Опубликовано: 26.09.2018 Бюл. № 27

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Бойко Светлана Сергеевна (RU),  
 Яценко Елена Сергеевна (RU),  
 Евдокимов Иван Юрьевич (RU),  
 Ширманов Максим Вячеславович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: БОЙКО С.С., Инициация  
 прорастания спор *Bacillus subtilis*  
 ультразвуком // XIV Международной  
 конференции студентов, аспирантов и  
 молодых ученых, Томск, 25-28 апреля 2017,  
 стр. 25-27. SU 935529 A1, 15.06.1982. RU  
 2137837 C1, 20.09.1999. KZ 22180 A4,  
 15.01.2010.

(54) Способ активации спор бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 перед определением количества жизнеспособных клеток

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Предложен способ активации спор бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 перед определением количества жизнеспособных клеток. Способ включает активацию сухих спор *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 ультразвуком в

течение 15-20 секунд при температуре 32-34°C, частоте колебаний 35-37 кГц и мощности 140 Вт. Изобретение обеспечивает уменьшение времени активации, повышение безопасности работ и точности результатов. 1 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12Q 1/06* (2006.01)  
*C12M 1/42* (2006.01)  
*C12R 1/125* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12N 3/00* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01); *C12M 1/42* (2006.01)

(21)(22) Application: **2017144488, 18.12.2017**

(24) Effective date for property rights:  
**18.12.2017**

Registration date:  
**26.09.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **18.12.2017**

(45) Date of publication: **26.09.2018** Bull. № 27

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Bojko Svetlana Sergeevna (RU),  
Yatsenko Elena Sergeevna (RU),  
Evdokimov Ivan Yurevich (RU),  
Shirmanov Maksim Vyacheslavovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR ACTIVATING BACILLUS SUBTILIS VKPM B-12079 BACTERIA SPORES BEFORE DETERMINING NUMBER OF VIABLE CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry. Method is proposed for activating spores of *Bacillus subtilis* bacteria VKPM B-12079 before determining the number of viable cells. Method includes activation of dry spores of *Bacillus subtilis* VKPM B-12079 with

ultrasound for 15–20 seconds at a temperature of 32–34 °C, the frequency of oscillations 35–37 kHz and power 140 W.

EFFECT: invention provides reduced activation time, increased work safety and accuracy of the results.  
1 cl, 1 tbl, 1 ex

RU 2 668 180 C 1

RU 2 668 180 C 1

Область техники

Изобретение относится к микробиологии, биотехнологии и может быть использовано для уменьшения времени активации и повышения эффективности и безопасности метода количественного определения жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079.

5 Препараты на основе *Bacillus subtilis* используются для получения пробиотических средств, биоконсервантов, биологических фунгицидов, биологических дезинфектантов и т.д. Штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 составляет основу кормовой добавки «Энзимспорин». Поскольку, количество жизнеспособных микроорганизмов в готовом продукте, является одним из важных показателем его качества, искажение этих  
10 результатов недопустимо.

Известен способ определения количества живых микроорганизмов (метод Коха), заключающийся в высеве микробных суспензий на плотную питательную среду. Данный способ включает в себя последовательные десятикратные разведения микробной суспензии, высева конечного разведения на плотную питательную среду, инкубацию в  
15 условиях, определяемых видом микроорганизма, подсчет выросших колоний и определение количества живых клеток в единице объема исследуемой микробной суспензии [1].

Недостатком является то, что не учитывается специфика спорообразующих микроорганизмов, так как спорообразующим бактериям (в т.ч. *Bacillus subtilis* ВКПМ  
20 В-12079) для прорастания споры необходимо 2-3 часа в обычных условия или активация перед приготовлением суспензии [2].

В качестве прототипа выбран метод определения количества жизнеспособных спорных бактерий, указанный в СТО 40092868-0003-2016 (стандарт ООО «Алтбиотех» Фермасил, технические условия СТО 33976740-0001-2017) кормовая добавка  
25 «Энзимспорин».

Определение количества жизнеспособных клеток бактерий проводят путем посева соответствующего разведения пробы на агаризованную среду. Для этого от каждой партии биопрепарата отбирают навеску массой 1,0 г. Отобранные пробы в асептических условиях разводят стерильным физиологическим раствором в пробирках объема 10  
30 мл. Содержимое пробирок перемешивают до гомогенной суспензии на водяной бане при температуре 80 С° в течение 15 минут. Из полученной взвеси готовят серию десятикратных разведений. Из двух последних разведений делают высевы на чашки Петри. Чашки с посевом помещают в термостат на 24 часа, при температуре 37 С°.

Недостатками данного метода являются:

35 - трудоемкость;  
- работа с горячей водяной баней является опасной;  
- затраты времени, для подготовки водяной бани, прогрева пробирок и охлаждение пробирок до комнатной температуры;  
- если для приготовления суспензии использовали споры, которые были активированы  
40 кратковременным прогреванием, это может привести к увеличению процента проросших спор [2]. Что в свою очередь, может исказить результат анализа готового биологического продукта.

Метод определения количества жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 является основным в процессе технологического контроля и контроля качества готовой продукции биологических препаратов. Искажение его результатов негативно скажется на технологическом процессе и качестве готового биопрепарата.

Цель изобретения - разработка быстрого, безопасного, эффективного метода активации спор бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 в процессе определения

количества жизнеспособных клеток бактерий споровых микроорганизмов *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079.

В предложенном способе технический результат достигается тем, что сухие лиофилизированные споры *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 активируют ультразвуком в течение 15-20 секунд при температуре 32-34°C, частоте колебаний 35-37 кГц и мощности 140 Вт перед приготовлением микробной суспензии. Затем проводят стандартный метод последовательных десятикратных разведений с высевом в чашки Петри с агаризованной средой. Таким образом, время активации снижается с 15 минут до 15-20 секунд, устраняется стадия прогрева на водяной бане, что повышает безопасность работ, после разведения на твердую среду будут высеваны вегетативных клеток, а не спор, что повышает точность результатов и соответствует методу Коха.

Описание изобретения

Способ осуществляется следующим образом.

0,1 г сухих спор *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 помещают в асептических условиях в стерильную микропробирку на 1,5 мл, которую плотно закрывают. Затем производят активацию спор ультразвуком при температуре 32-34°C, частоте колебаний 35-37 кГц и мощности 140 Вт определенное время (пример). Для обработки спор может быть использована любая ультразвуковая установка, соответствующая заявленным выше параметрам. Затем, в микропробирку добавляют 1 мл питательной среды, которую предварительно готовят, при следующем соотношении компонентов (г/л): пептон ферментативный - 15, дрожжевой экстракт - 5, натрий хлористый - 5, остальное - дистиллированная вода. Значение рН 7,0-7,2. Стерилизуют при 1,1 атм. в течение 40 мин.

Затем 1 мл суспензии из микропробирки переносят в пробирку с 9 мл раствора хлорида натрия с массовой долей хлорида натрия 8,5 г/л и далее производят разбавление стандартным методом последовательных десятикратных разведений с высевом в чашки Петри со стандартной агаризованной средой. Чашки помещают в термостат на 24 часа, температура 37°C. Затем осуществляют подсчет колоний, с учетом разведений и навески сухих спор.

Пример 1.

0,1 г сухих спор *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 помещают в асептических условиях в стерильную микропробирку на 1,5 мл, которую плотно закрывают. Затем производят активацию спор ультразвуком при температуре 32-34°C, частоте колебаний 35-37 кГц и мощности 140 Вт определенное время от 5 до 60 сек. После этого в микропробирку добавляют 1 мл питательной среды, которую предварительно готовят, при следующем соотношении компонентов (г/л): пептон ферментативный - 15, дрожжевой экстракт - 5, натрий хлористый - 5, остальное - дистиллированная вода. Значение рН 7,0-7,2. Стерилизация при 1,1 атм. в течение 40 мин.

Далее, методом микрокопирования, оценивалось, какое количество спор и вегетативных клеток, вышедших из спор, в процессе активации ультразвуком, находится в пробе, в зависимости от времени воздействия ультразвука на споры. Количество микроорганизмов *Bacillus subtilis* ВКПМ- В-12079 определялось для каждой пробы стандартным методом десятикратных разведений (метод Коха) после проведения активации. Все опыты проводились в семикратном повторении.

45

Таблица 1. Зависимость количества микроорганизмов, времени выхода из спор от времени активации ультразвуком

Воздействие ультразвуком, сек	-	5	10	<b>15</b>	<b>20</b>	25	30	35	40	45	50	55	60
Время, при котором происходит выход из спор не менее 95%, мин	120	120	50	<b>40</b>	<b>40</b>	40	40	40	40	40	40	40	40
КОЕ, п* 10 <sup>11</sup>	1,64	1,64	1,64	<b>1,64</b>	<b>1,64</b>	<b>1,68</b>	1,72	1,83	2,15	2,16	2,38	2,43	2,48
КОЕ, %	100	100	100	100	100	<b>103</b>	<b>104</b>	<b>112</b>	<b>131</b>	<b>132</b>	<b>145</b>	<b>148</b>	<b>151</b>

Из приведенных данных видно, что активация ультразвуком в течение 15-20 сек. способствует ускоренному выходу *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 из спор за счет механического повреждения споры, т.е. через 40 минут, к окончанию процесса десятикратных разбавлений, 95-99% спор перейдет в вегетативное состояние. Без активации, процесс выхода из спор занимает 2-3 часа [2]. В этом случае, на твердую агаризованную среду происходит высеивание спор, а не вегетативных клеток, что может исказить результат.

При активации более 20 сек. начинается рост численности микроорганизмов, за счет стимулирующего действия ультразвука со 100 до 151% [3]. Это приводит к искажению данных об исходном количестве спор в пробе.

Таким образом, оптимальное время активации спор бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 ультразвуком при температуре 32-34°C, частоте колебаний 35-37 кГц и мощности 140 Вт составляет 15-20 сек. Предложенный способ позволяет:

- уменьшить время активации с 15 минут до 15-20 секунд;
- устраняется стадия прогрева на водяной бане, что повышает безопасность работ;
- после разведения на твердую агаризованную среду высеивают вегетативные клетки, а не споры, что повышает точность результатов.

#### Литература

1. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. Пушино, 1990. - 187 с.
2. Ноздрин Г.А. Научные основы применения пробиотиков в птицеводстве. - Новосибир. гос. аграр. ун-т. - Новосибирск, 2005. - 224 с.
3. Бойко С.С., Яценко Е.С. Влияние ультразвука на *Bacillus subtilis* в процессе стационарного культивирования // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности. Материалы X Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. - Бийск, 2017. - С. 321-324.

#### (57) Формула изобретения

Способ активации спор бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 перед определением количества жизнеспособных клеток спорных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, отличающийся тем, что сухие споры *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 активируют ультразвуком в течение 15-20 секунд при температуре 32-34°C, частоте колебаний 35-37 кГц и мощности 140 Вт.