



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/125 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2018100936, 10.01.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
10.01.2018

Дата регистрации:  
26.09.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.01.2018

(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):

Рыженков Никита Сергеевич (RU),  
Яценко Елена Сергеевна (RU),  
Микушина Ирина Владимировна (RU),  
Ширманов Максим Вячеславович (RU),  
Евдокимов Иван Юрьевич (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., ЯЦЕНКО Е.С.  
"Влияние ультразвука на *Bacillus subtilis* в  
процессе стационарного культивирования"  
Технологии и оборудование химической,  
биотехнологический и пищевой  
промышленности. Материалы X  
Всероссийской научно-практической  
конференции студентов, аспирантов и  
молодых ученых с международным  
участием. - Бийск, 2017, с.322-325. RU (см.  
прод.)

(54) Питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis*

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и  
микробиологии. Питательная среда для  
культивирования бактерий *Bacillus subtilis*  
содержит пептон ферментативный, дрожжевой  
экстракт, натрий хлористый, 40%-ный спиртовой

экстракт кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba  
officinalis* L.) и дистиллированную воду при  
заданном соотношении компонентов.  
Изобретение позволяет повысить выход биомассы  
бактерий *Bacillus subtilis*. 3 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

2100029 C1, 27.12.1997. СИДОРОВ М.А., СКОРОДУМОВ Д.И. ФЕДОТОВ В.Б., Определитель  
зоопатогенных микроорганизмов. Справочник. М, Колос, 1995, с. 108-112. RU 22220736 C1, 10.01.2004.

RU 2 668 178 C1

RU 2 668 178 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/125* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12N 1/20* (2006.01); *C12R 1/125* (2006.01)

(21)(22) Application: **2018100936, 10.01.2018**

(24) Effective date for property rights:  
**10.01.2018**

Registration date:  
**26.09.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **10.01.2018**

(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):

**Ryzhenkov Nikita Sergeevich (RU),  
Yatsenko Elena Sergeevna (RU),  
Mikushina Irina Vladimirovna (RU),  
Shirmanov Maksim Vyacheslavovich (RU),  
Evdokimov Ivan Yurevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF BACILLUS SUBTILIS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and microbiology. Nutrient medium for the cultivation of *Bacillus subtilis* bacteria contains peptone enzymatic, yeast extract, sodium chloride, 40 % alcohol extract of

the blood-groove medicinal (*Sanguisorba officinalis* L.) and distilled water at a given ratio of components.

EFFECT: invention makes it possible to increase the yield of the biomass of *Bacillus subtilis* bacteria.

1 cl, 3 tbl, 3 ex

RU 2 668 178 C1

RU 2 668 178 C1

Область техники

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается питательной среды для культивирования бактерии *Bacillus subtilis*.

5 Составы питательных сред для культивирования *Bacillus subtilis* хорошо изучены на лабораторном и промышленном уровнях.

Известна питательная среда для стационарного культивирования *Bacillus subtilis* - мясопептонный бульон (МПБ). Мясопептонный бульон готовится из мясной воды, к которой добавляют 1% пептона и 0,5% натрия хлористого. Мясную воду получают путем проварки в 2-4-кратном объеме водопроводной воды мяса или фарша крупного 10 рогатого скота или лошадей в течение 1 ч с последующей фильтрацией [1].

Недостатком данной среды является дороговизна используемых компонентов и сложная технология приготовления. Применение данной среды для промышленного производства трудновыполнимо.

В качестве прототипа для культивирования *Bacillus subtilis* к заявляемой питательной 15 среде является L-бульон. Он готовится 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, при культивировании *Bacillus subtilis* ВКПМ 20 В-12079 максимальное количество организмов не выше  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл.

Цель работы, состоит в создании питательной среды, содержащей доступное и дешевое сырье и обеспечивающей количество *Bacillus subtilis* выше  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл.

Технический результат, который может быть получен при осуществлении изобретения, 25 состоит в повышении количества *Bacillus subtilis* выше  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл.

Описание изобретения

Для достижения указанного технического результата для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, *Bacillus subtilis* В-2896, *Bacillus subtilis* В-2895 *Bacillus subtilis* В-4828 *Bacillus subtilis* В-1323 *Bacillus subtilis* В-5449 предложено использовать питательную 30 среду, состоящую из (г/л): дрожжевой экстракт - 5, пептон ферментативный - 15, хлорид натрия - 5, 40% спиртовой экстракт кровохлебки лекарственной - 20 мл/л и дистиллированная вода, доведенная до объема 1 л. (рН 6,8-7,0). Стерилизацию среды проводили после внесения экстракта при давлении 1,1 атм. в течение 40 минут.

Приготовление экстракта включает в себя экстрагирование растительного сырья. 35 Растительное сырье должно быть высокого качества (сбор кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L.) осуществлялся в июне 2017 в Алтайском крае).

В данной работе использовали аппарат Сокслета. На 1 г воздушно-сухого вещества использовали 15 мл растворителя. В качестве растворителей выбрали 96%-ый и 40%-ый растворы этанола. В патрон из белой фильтровальной бумаги добавляли по 10 г 40 воздушно-сухого растительного сырья, после чего закрывали с обеих сторон и помещали в экстрактор Сокслета. В колбу добавляли 150 мл 96%-ного растворителя и начинали экстрагирование на водяной бане. Для 40%-ного раствора этанола экстрагирование проводили на воздушной бане. Продолжительность экстрагирования - 3 часа, количество циклов -10. На выходе получали спиртовой или водно-спиртовой экстракт растительного 45 сырья. Опыт поясняется следующими примерами.

Пример 1.

Для приготовления жидкой питательной среды в колбу Эрленмейера (объем 50 мл) добавляли компоненты среды, при соотношении г/л: дрожжевой экстракт - 5, пептон

- 15, хлорид натрия - 5, определенные объемы 96%-ного спиртового экстракта кровохлебки лекарственной, дистиллированная вода -до 1 л. (рН 6,8-7,0). Закрывали ватно-марлевой пробкой и стерилизовали при давлении 1,1 атм. в течение 40 минут. Затем, в остывшую жидкую питательную среду (объем 50 мл) в стерильных условиях вносили навеску 0,5 г лиофилизированно высушенных спор *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079.

Культивирование производили в шейкер-инкубаторе "Innova 44" (New Brunswick, США) при вращении со скоростью 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), при температуре 37°C в течение 24 часов.

Для определения количества микроорганизмов использовали стандартный метод десятикратных разведений с пересевом на питательный агар, приготовленный при следующем соотношении компонентов (г/л): дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, агар-агар - 18, дистиллированная вода - до 1 л. (рН 6,8-7,0). Стерилизацию проводили при давлении 1,1 атм. в течение 40 минут. После чего термостатировали при температуре 37°C в течение 24 часов. В качестве контрольной пробы использовали среду, без внесения экстракта кровохлебки лекарственной. Эксперименты проведены семь раз.

Таблица 1. Результаты влияния 96%-ного спиртового экстракта кровохлебки на стимуляцию роста *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079.

Концентрация экстракта (мл/л)	Количество бактерий, КОЕ*10 <sup>10</sup> /мл
2	310 ±90
6	170 ±40
10	360 ±40
15	360 ±30
<b>20</b>	<b>1210 ±30</b>
40	150 ±20
0	390±70

Из приведенных статистических данных видно (табл. 1), что максимальное увеличение количества бактерий достигается при добавлении 20 мл 96%-ного спиртового экстракта кровохлебки в L-бульон.

#### Пример 2

Для приготовления жидкой питательной среды в колбу Эрленмейера (объем 50 мл) добавляли компоненты среды, при соотношении г/л: дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, определенные объемы 40%-ного спиртового экстракта кровохлебки лекарственной, дистиллированная вода -до 1 л. (рН 6,8-7,0). Закрывали ватно-марлевой пробкой и стерилизовали при давлении 1,1 атм. в течение 40 минут. Затем, в остывшую жидкую питательную среду (объем 50 мл) в стерильных условиях

вносили навеску 0,5 г лиофилизированно высушенных спор *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079.

5 Культивирование производили в шейкер-инкубаторе "Innova 44" (New Brunswick, США) при вращении со скоростью 250 оборотов в минуту (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C в течение 24 часов.

10 Для определения количества микроорганизмов использовали стандартный метод десятикратных разведений с пересевом на питательный агар, приготовленный при следующем соотношении компонентов (г/л): дрожжевой экстракт - 5, пептон - 15, хлорид натрия - 5, агар-агар - 18, дистиллированная вода - до 1 л. (рН 6,8-7,0). Стерилизацию проводили при давлении 1,1 атм. в течение 40 минут. Затем термостатировали при температуре 37°C в течение 24 часов. В качестве контрольной пробы использовали среду, без внесения экстракта кровохлебки лекарственной. Эксперименты проведены в семикратной повторности.

15 Таблица 2. Результаты влияния 40%-ного спиртового экстракта кровохлебки на стимуляцию роста *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079.

Концентрация экстракта (мл/л)	Количество бактерий, КОЕ*10 <sup>10</sup> /мл
2	360 ±20
6	190 ±40
10	80 ±10
15	970 ±140
<b>20</b>	<b>2600 ±130</b>
40	160 ±30
0	390±70

Из приведенных статистических данных (табл. 2) видно, что максимальное увеличение количество бактерий достигается при добавлении 20 мл 40%-ного спиртового экстракта кровохлебки лекарственной в L-бульон. При сравнении статистиках данных стимулирующей активности экстрактов кровохлебки лекарственной выявлено, что добавление 20 мл 40%-ного спиртового экстракта кровохлебки эффективней в два раза (1210±30 КОЕ × 10<sup>10</sup>/мл и 2600±130 КОЕ × 10<sup>10</sup>/мл соответственно).

Пример 3

40 Таблица 3. Результаты влияния 40%-ного спиртового экстракта кровохлебки на стимуляцию роста *Bacillus subtilis*, при внесении 20 мл/л стимулятора в питательную среду.

45

Штамм	Содержание бактерий, КОЕ×10 <sup>10</sup> /мл с добавления в L-бульон 40%-ного спиртового экстракта кровохлёбки	Содержание бактерий, КОЕ×10 <sup>10</sup> /мл без добавления в L-бульон 40%-ного спиртового экстракта кровохлёбки
<i>Bacillus subtilis</i> ВКПМ В-12079	2600 ±130	390±70
<i>Bacillus subtilis</i> В-2896	1200±20	380±20
<i>Bacillus subtilis</i> В-2895	1900±210	410±20
<i>Bacillus subtilis</i> В-1323	742±30	310±30
<i>Bacillus subtilis</i> В-4828	2850±190	360±30
<i>Bacillus subtilis</i> В-5449	1285±190	302±20

Из приведенных данных видно (табл. 3), что стимулирование роста количества различных штаммов бактерии *Bacillus subtilis* при внесении 20 мл/л в питательную среду 40%-ного спиртового экстракта кровохлёбки от 2 до 8 раз.

Таким образом, предлагаемая питательная среда для культивирования различных штаммов бактерии *Bacillus subtilis* содержит не дорогое и доступное сырье, а его использование позволяет повысить количество микроорганизмов от 2 до 8 раз, относительно контроля.

Литература.

1. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. - М: Медицина, 2005. - С. 480.
2. 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

Питательная среда для культивирования бактерий *Bacillus subtilis*, содержащая дрожжевой экстракт, пептон, хлорид натрия, дистиллированную воду - до 1 л (рН 6,8-7,0), отличающаяся тем, что включает 40% спиртовой экстракт кровохлёбки (*Sanguisorba officinalis* L.) при следующем соотношении компонентов, г/л:

Пептон	15
Дрожжевой экстракт	5
Хлорид натрия	5
40% спиртовой раствор кровохлёбки	20 мл
вода водопроводная	до 1л