



(51) МПК
C12M 1/04 (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12M 1/04 (2020.08); *C12M 1/36* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018139937, 12.11.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 12.11.2018

Дата регистрации:
 25.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.11.2018

(43) Дата публикации заявки: 12.05.2020 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 25.12.2020 Бюл. № 36

Адрес для переписки:
 610000, г. Киров, Октябрьский пр-кт, 119,
 Филиал федерального государственного
 бюджетного учреждения "48 Центральный
 научно-исследовательский институт"
 Министерства обороны Российской Федерации

(72) Автор(ы):

Сапрыкина Людмила Николаевна (RU),
 Багаев Алексей Сергеевич (RU),
 Подволовский Александр Николаевич (RU),
 Бакулин Владимир Михайлович (RU),
 Путятин Михаил Анатольевич (RU),
 Кибирев Александр Васильевич (RU),
 Тетерин Владимир Валентинович (RU),
 Филиппов Алексей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение "48 Центральный
 научно-исследовательский институт"
 Министерства обороны Российской
 Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: SCIENCEWARE® Lab
 Companion™, Vacuum Desiccators // Lit No. 205,
 February 2013, стр.1-4. EP 0089830 A2,
 28.09.1983. US 6063619 A, 16.05.2000. DD 262037
 A1, 16.11.1988. RU 2040170 C1, 25.07.1995.

(54) УСТРОЙСТВО ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

(57) Реферат:

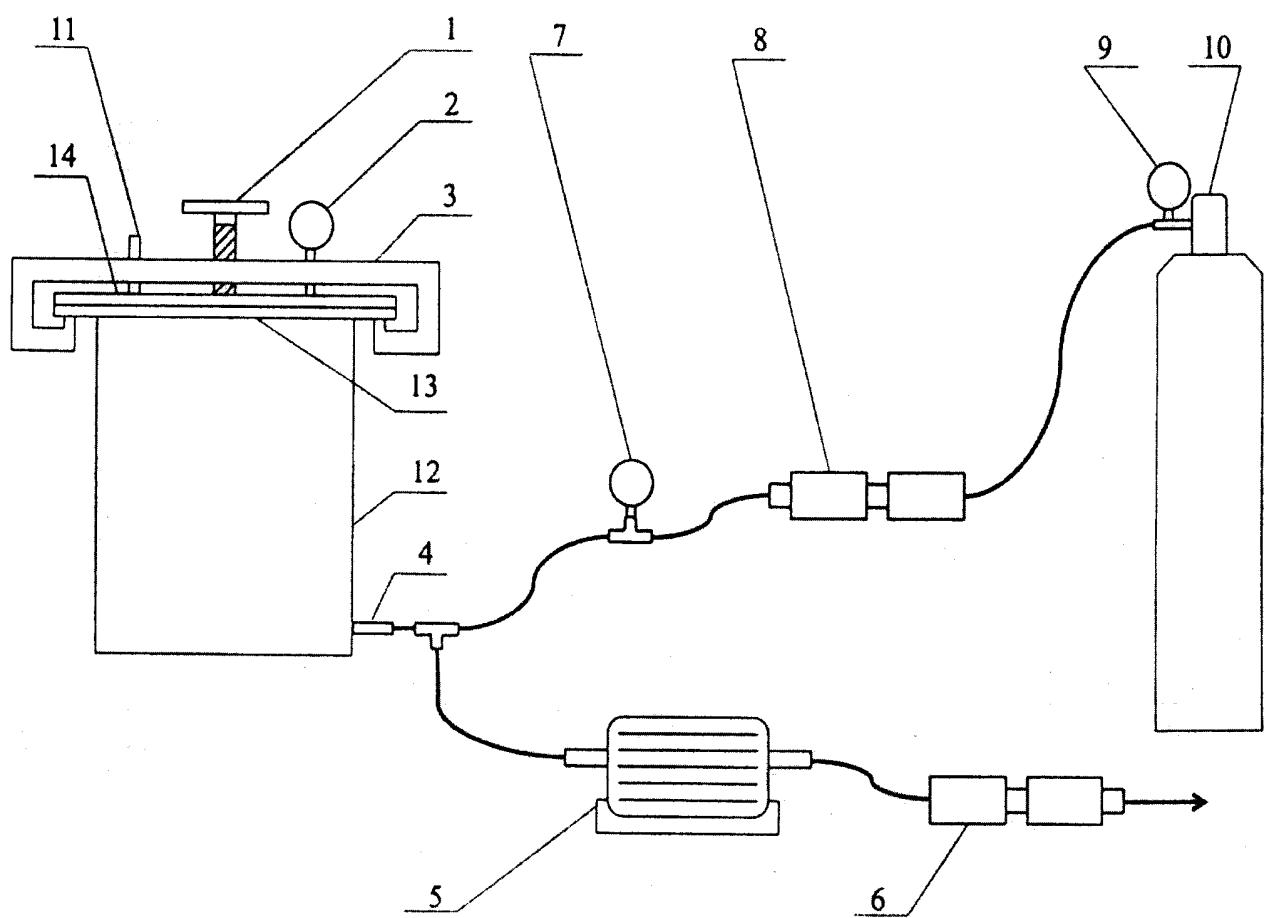
Изобретение относится к области биотехнологии. Предложено устройство для культивирования анаэробных бактерий. Устройство состоит из рабочей емкости, крышки с фланцами, вспомогательной планкой с Г-образными концами и Т-образным винтом. Крышка содержит штуцеры с присоединенным мановакуумметром и трубкой для стравливания вакуума, рабочая емкость содержит штуцер с подсоединенным вакуумным насосом и

газонаполнительным оборудованием. Рабочая емкость имеет полезный объем не менее 15 дм³, а все конструктивные детали выполнены из стали марки 12Х18Н10Т. Изобретение обеспечивает возможность выращивания анаэробов в условиях глубокого вакуума или в безвоздушной газовой среде определенного состава с использованием лабораторной посуды большой вместимости. 1 ил., 1 табл.

R U 2 7 3 9 5 0 3 C 2

R U 2 7 3 9 5 0 3 C 2

R U 2 7 3 9 5 0 3 C 2



R U 2 7 3 9 5 0 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12M 1/04 (2020.08); C12M 1/36 (2020.08)

(21)(22) Application: 2018139937, 12.11.2018

(24) Effective date for property rights:
12.11.2018

Registration date:
25.12.2020

Priority:

(22) Date of filing: 12.11.2018

(43) Application published: 12.05.2020 Bull. № 14

(45) Date of publication: 25.12.2020 Bull. № 36

Mail address:

610000, g. Kirov, Oktyabrskij pr-kt, 119, Filial federalnogo gosudarstvennogo byudzhetnogo uchrezhdeniya "48 Tsentralnyj nauchno-issledovatelskij institut" Ministerstva oborony Rossijskoj Federatsii

(72) Inventor(s):

Saprykina Lyudmila Nikolaevna (RU),
Bagaev Aleksej Sergeevich (RU),
Podvolotskij Aleksandr Nikolaevich (RU),
Bakulin Vladimir Mikhajlovich (RU),
Putyatin Mikhail Anatolevich (RU),
Kibirev Aleksandr Vasilevich (RU),
Teterin Vladimir Valentinovich (RU),
Filippov Aleksej Vladimirovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "48 Tsentralnyj nauchno-issledovatelskij institut" Ministerstva oborony Rossijskoj Federatsii (RU)

C2

(54) DEVICE FOR CULTIVATION OF ANAEROBIC BACTERIA

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: apparatus for culturing anaerobic bacteria is disclosed. Device consists of working container, cover with flanges, auxiliary plate with L-shaped ends and T-like screw. Cover comprises nozzles with connected anneal vacuum tube and tube for vacuum evacuation, working vessel comprises union with connected vacuum pump and gas filling equipment.

Working capacity has useful volume of not less than 15 dm³, and all structural parts are made from 12X18H10T steel.

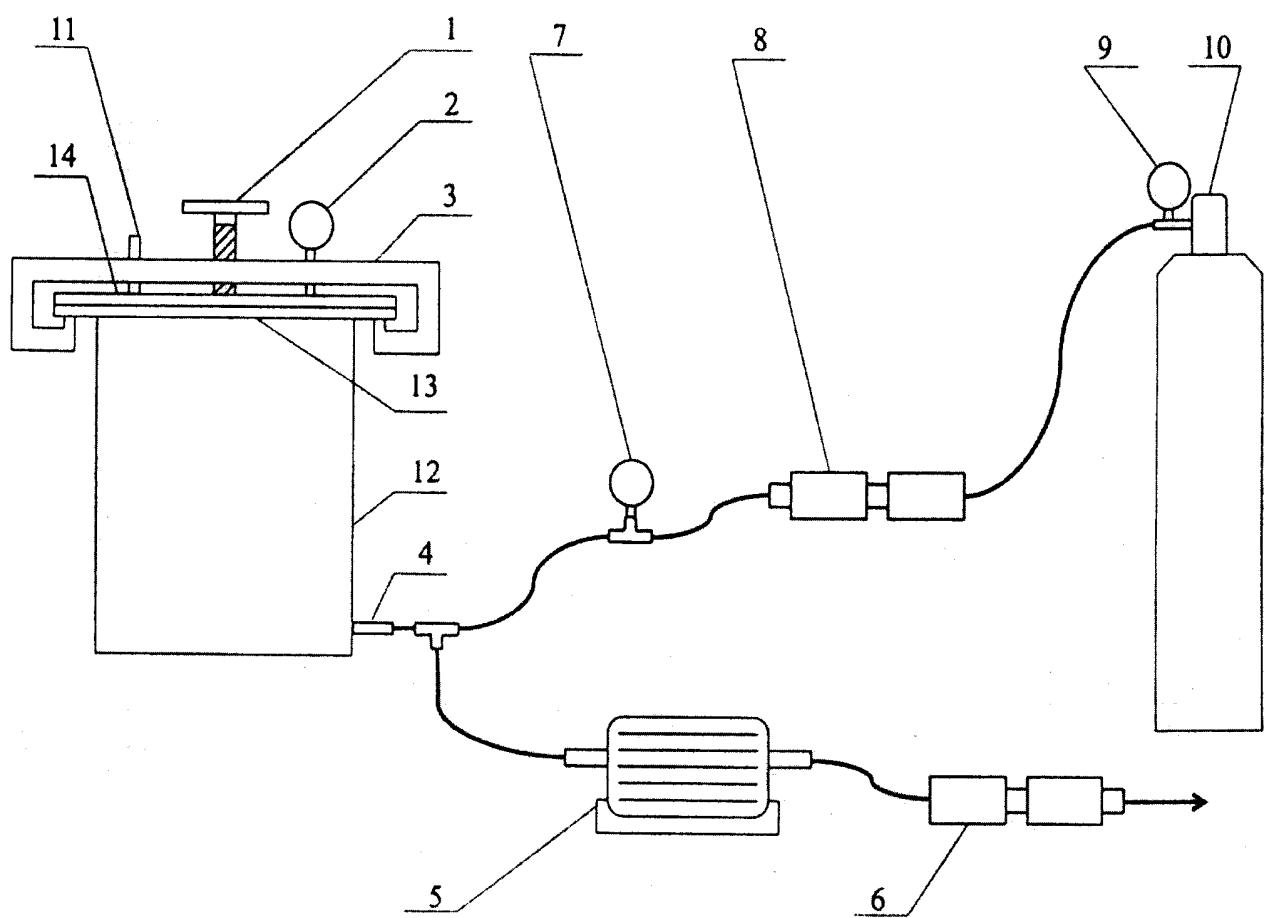
EFFECT: invention provides the possibility of growing anaerobes under conditions of deep vacuum or in an airless gas medium of a certain composition using laboratory dishes of large capacity.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl

RU

R
U
2
7
3
9
5
0
3
C
2

R U 2 7 3 9 5 0 3 C 2



R U 2 7 3 9 5 0 3 C 2

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к устройству для культивирования анаэробных микроорганизмов и микроаэрофилов.

Анаэробы - микроорганизмы бактериальной природы, которым для нормальной жизнедеятельности, роста и размножения необходимо пониженное содержание

5 кислорода или его полное отсутствие в среде обитания.

По отношению к кислороду анаэробы делятся на строгие (облигатные) анаэробы, которые практически не способны расти в присутствии кислорода, и условные (факультативные) анаэробы, которые могут расти и развиваться как в присутствии кислорода, так и без него. К первой группе относятся большинство клостридий, бактерии

10 молочнокислого и маслянокислого брожения, ко второй группе - кокки, грибки и др.

Существуют также микроорганизмы, требующие для своего развития небольшой концентрации кислорода - микроаэрофилы (*Clostridium* spp., *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Bifidumbacterium* spp., *Lactobacillus* spp.).

Культивирование анаэробных микроорганизмов - сложный биотехнологический

15 процесс, важнейшей особенностью которого является создание и поддержание безвоздушной среды, необходимой для нормальной жизнедеятельности и роста. Более того, контакт облигатных анаэробов с кислородом воздуха вызывает их быструю гибель. Критическое время выживания у большинства облигатных анаэробных микроорганизмов при контакте с воздухом не превышает, как правило, 15-60 минут.

20 Поэтому, одной из основных биотехнологических задач, при выращивании анаэробов, является создание устройств, обеспечивающих поддержание анаэробиоза (бескислородной среды) в процессе культивирования анаэробных бактерий.

Для создания анаэробных условий в биотехнологии применяют следующие методы:

- 1) удаление кислорода из среды путем выкачивания воздуха или вытеснения
- 25 2) индифферентным газом;
- 3) химическое поглощение кислорода при помощи гидросульфита натрия или пирогаллола;
- 4) комбинированное механическое и химическое удаление кислорода;
- 5) биологическое поглощение кислорода облигатными аэробными микроорганизмами,
- 30 посевными на одной половине чашки Петри (метод Фортнера);
- 5) частичное удаление воздуха из жидкой питательной среды путем ее кипячения, добавления редуцирующих веществ (глюкоза, тиогликолат, цистеин, кусочки свежего мяса или печени) и заливки среды вазелиновым маслом;
- 6) механическую защиту от кислорода воздуха, осуществляющую путем посева
- 35 анаэробов в высокий столбик агара в тонких стеклянных трубках по методу Вейона.

Однако, одним из наиболее доступных и простых в технологическом плане способов создания анаэробных условий является вакуумзаместительный метод.

В настоящее время для лабораторных целей разработаны и выпускаются несколько моделей анаэростатов, предназначенных для культивирования анаэробов в чашках Петри и пробирках, отличающихся материалом изготовления и запорным механизмом крышек. В большинстве анаэростатов безвоздушная среда создается за счет использования специальных газогенерирующих пакетов.

Известен анаэростат АЭ-01, предназначенный для культивирования облигатных анаэробных микроорганизмов в чашках Петри. Анаэростат представляет собой

45 цилиндрическую емкость, в которой герметизация рабочей емкости осуществляется с помощью ленточного замка. Емкость и крышка выполнены из оптически прозрачной пластмассы. Анаэростат рассчитан на 10 чашек Петри. Создание необходимой атмосферы для культивирования микроорганизмов возможно как с помощью

химических газогенерирующих пакетов, так и посредством вакуумзаместительного заполнения анаэростата бескислородными газами или газовыми смесями.

Известна анаэробная станция «Bactron», предназначенная для работы со всеми микроорганизмами, чувствительными к присутствию кислорода, в том числе с

5 факультативными и строгими анаэробами. Анаэробная станция «Bactron» представляет собой изолированный перчаточный бокс со встроенным инкубатором для создания стабильного анаэробиоза при исследованиях (индикации и идентификации) микроорганизмов, чувствительных к присутствию кислорода и малопригодна для получения рабочих и посевных культур.

10 Известен анаэростат (см. патент N 2131461, кл. C12M, 1/00, заявка №96103166/13, 19.02.96, опубл. 27.04.98), в котором герметичность рабочей емкости обеспечивается стягиванием стяжной лентой прижимов, которые охватывают наклонные грани клиновидных фланцев крышки и рабочей емкости. Данный анаэростат был выбран в качестве прототипа. Создание необходимой атмосферы для культивирования

15 микроорганизмов возможно как с помощью химических газогенерирующих пакетов, так и посредством вакуумзаместительного заполнения анаэростата бескислородными газами или газовыми смесями.

20 Принципиальным недостатком всех известных анаэростатов является то, что они не позволяют проводить культивирование анаэробов на твердых и в жидких питательных средах с использованием больших лабораторных емкостей (матрацы, колбы и бутыли до 5 дм³ и т.п.). Это не позволяет надежно обеспечить последующие стадии биотехнологического производства по наработке анатоксинов и диагностических препаратов в необходимых количествах. Кроме того, материалы из которых 25 изготовлены анаэростаты не предполагают использование в многократных циклах тепловой стерилизации и обработки концентрированными дезинфектантами. Крайне важно, что в комплекты поставок не входят газогенерирующие пакеты и необходимое газовое оборудование, что значительно увеличивает стоимость установок и усложняет их эксплуатацию.

25 Задача настоящего изобретения заключается в разработке устройства многократного использования для выращивания анаэробов в условиях глубокого вакуума и в безвоздушной газовой среде определенного состава с использованием лабораторной посуды большой вместимости (матрацы, колбы и бутыли до 5 дм³ и т.п.), надежно 30 обеспечивающей создание необходимых посевных доз на следующих стадиях получения анатоксинов и диагностических препаратов.

35 Устройство предназначено как для автономной работы с использованием вакуумного насоса, так и для применения в стационарных условиях.

Устройство для культивирования анаэробных бактерий (чертеж) конструктивно 40 состоит из рабочей емкости (12) с крышкой (14), выполненной с фланцами (13). В крышку вмонтированы штуцер для присоединения мановакууметра (2), а также трубка для стравливания вакуума (11). Снизу к рабочей емкости через штуцер (4) 45 подсоединяются гибкие трубопроводы газонаполнительного оборудования и вакуумного насоса (5). Анаэробные условия в установке создаются путем вакуумирования рабочей емкости, т.е. удаления свободного кислорода и доведения оставшегося в рабочем объеме устройства газа до давления ниже атмосферного. Разрежение в анаэростате создается вакуумным насосом и контролируется 50 мановакууметром. Рабочая емкость и крышка выполнены из нержавеющей стали марки 12Х18Н10Т.

Устройство работает следующим образом. В рабочую емкость устанавливают чашки

Петри, флаконы, пробирки, колбы, бутыли с посевами культур анаэробных микроорганизмов. После установки лабораторной посуды с посевами осуществляют прижим крышки к фланцу рабочей емкости. Герметизация крышки осуществляется с помощью вспомогательной планки с Г-образными концами (3) и Т-образного винта (1), обеспечивающих максимально плотное соединение крышки с фланцем рабочей емкости.

После этого производят вакуумирование устройства с помощью вакуумного насоса. Контроль создаваемого разрежения осуществляется мановакууметром, расположенным на крышке. Удаляемый из рабочей емкости воздух отводится через противогазовые коробки ЕО-16 (6) в вытяжную систему лаборатории.

Создание необходимой для культивирования микроорганизмов газовой атмосферы в анаэростате обеспечивается с помощью подсоединенного через тройник газоподающего оборудования. В состав данного оборудования входят: баллоны (10) с необходимыми газами (аргон, углекислый газ и др.), газовые редукторы и манометры. Контроль подачи газов осуществляется при помощи манометров на газовом редукторе (9) (общее давление в баллоне) и манометра (7) на гибкой линии подачи газа (давление подаваемого газа). Подаваемый газ из баллонов проходит через противогазовые коробки ЕО-16(8) с целью его очистки от посторонних примесей. Сравнительные характеристики предлагаемого изобретения с известными аналогами представлены в таблице 1.

25

30

35

40

45

Таблица 1 - Сравнительные характеристики предлагаемого изобретения с известными аналогами

Сравнительные характеристики	Заявляемый анаэростат	АЭ-01	Анаэростат-прототип (патент №2131461)
Вместимость рабочей емкости, дм ³	15	1	2
Количество устанавливаемых в рабочую емкость чашек Петри, штук	до 100	до 10	до 10
Возможность размещения в рабочей емкости лабораторной посуды объемом до 5 дм ³	возможно	невозможно	невозможно
Возможность многократного использования устройства после проведения различных режимов тепловой и химической стерилизации	возможно	невозможно	невозможно
Используемые конструктивные и расходные материалы	Отечественного производства	Импортного производства	
Время создания анаэробиоза	Не более 30-60 секунд	Не более 2-х часов	
Возможность культивирования фоточувствительных микроорганизмов	возможно	невозможно	невозможно

Эксплуатация установки показала, что вакуум или газовая атмосфера в рабочей емкости создаются в течение 30-60 секунд и сохраняются до двух и более суток. Перед взятием проб вакуум или газовая атмосфера аккуратно стравливаются через противогазовые коробки ЕО-16. В случае необходимости по показанию мановакуумметра условия могут корректироваться за счет увеличения вакуума или подачи газовой среды.

(57) Формула изобретения

Устройство для культивирования анаэробных бактерий, состоящее из рабочей емкости с крышкой, выполненной с фланцами, вспомогательной планкой с Г-образными концами и Т-образным винтом, характеризующееся тем, что крышка содержит штуцеры с присоединенным мановакуумметром и трубкой для стравливания вакуума, рабочая емкость содержит штуцер с подсоединенным вакуумным насосом и газонаполнительным оборудованием, состоящим из тройника, баллонов с необходимыми газами, газовых редукторов и манометров, причем рабочая емкость имеет полезный объем не менее 15 дм³ и выполнена с возможностью размещения необходимого количества лабораторной посуды, в том числе бутылей объемом до 5 дм³, а все конструктивные детали выполнены из стали марки 12Х18Н10Т.

