

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к производству сухих бактериальных препаратов. Цель изобретения - увеличение выхода жизнеспособных клеток при распылительном высушивании микробных суспензий.

В настоящее время сухие бакпрепараты, содержащие жизнеспособные клетки микроорганизмов широко используются в народном хозяйстве.

Известен способ защиты и консервирования микроорганизмов глинами, предусматривающий смешивание водных суспензий микроорганизмов и глинистых минералов и последующее удаление избытка влаги до получения состава, в котором клетки покрыты слоем глины (заявка Франции №2394606, кл. С12 К1/08, А 01N 15/00, опубл. 17.07.87).

Недостатком данного способа является необходимость многократного отмывания клеток микроорганизмов перед их смешиванием с суспензией глины.

Описан способ защиты и стабилизации бактерий, основанный на внесении в бактериальную суспензию глинистых минералов для получения вязкой смеси (заявка Франции № 2611214, МКИ С 12 N 1/20, А 23 Р 1/00, опубл. 26.08.88).

Недостатком данного способа является возможная потеря активности и инфицирование полученной вязкой смеси при ее хранении.

Предложен способ высушивания дрожжей в смеси с мукой, полученной из выжимок сахарной свеклы (заявка Японии № 61-51876). Такой способ требует сложной дополнительной обработки используемых материалов и к тому же не приемлем для ряда микроорганизмов, для которых введение в среду органических веществ сложного состава может сопровождаться ингибированием роста (например, метанотрофные бактерии).

Наиболее близок по технической сущности к заявляемому способ (авт.св. СССР № 1616990, кл. С 12 N 1/02, опубл. 30.12.90) получения сухих бактериальных препаратов, предусматривающий распылительное высушивание суспензии микроорганизмов после ее смешивания сначала с суспензией глинистого минерала палыгорскита, а затем с сухим молоком и последующим распылительным высушиванием полученной смеси. Однако, введение в такую смесь сухого молока значительно удорожает процесс и может ингибировать жизнедеятельность ряда микроорганизмов (к примеру, метанотрофных бактерий) и таким образом не всегда является приемлемым.

В основу изобретения поставлена задача создания сухих бакпрепаратов, в котором благодаря использованию глинистых минералов как на стадии культивирования микроорганизмов, так и при их подготовке к распылительному высушиванию обеспечивается взаимодействие клеток с этими высокодисперсными минералами и за счет этого создается удобная для хранения и применения сыпучая форма препарата с высоким титром жизнеспособных бактерий.

Поставленная задача решается тем, что в сухих бактериальных препаратах, полученных методом распылительного высушивания после смешивания суспензии микроорганизмов с глинистыми минералами согласно изобретению глинистые минералы вносятся в два приема. На стадии культивирования бактерий содержание глинистых минералов в питательной среде задают на уровне 0,2-20 г/л, а перед распылительным высушиванием суспензии их концентрацию увеличивают до 20-100 г/л.

Пример 1. Культуру микроорганизмов *Agrobacterium radiobacter* 204 выращивали при 30°C в колбах объемом 750 мл на качалках в течение 2 сут на среде следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  - 0,5;  $KH_2PO_4$  - 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,3;  $(NH_4)_2SO_4$  - 1,0;  $CaCO_3$  - 1,0; меласса - 10,0; кукурузный экстракт - 10,0, pH среды - 7,2-7,6.

В ряд колб вносили различные концентрации палыгорскита, монтмориллонита или другого глинистого минерала (табл.1). В контрольные колбы эти материалы не вносили. Колбы стерилизовали. После этого в них задавали по 50 мл питательной среды вышеприведенного состава, инокулированной данными микроорганизмами. Результат влияния этих минералов на рост микроорганизмов учитывали по количеству клеток, определяемому путем высева из серийных десятикратных разведений в агаризованную среду (1,5% агара) вышеприведенного состава. Данные исследований свидетельствуют о том, что глинистые минералы заметно повышают ростовую активность этих микроорганизмов, что выражается в более высокой их численности в присутствии данных минералов, по сравнению с контролем, где они не вносились.

В 2 л суспензии микроорганизмов с титром  $1,89 \cdot 10^9$  кл/мл, выращенной в присутствии глинистых минералов дополнительно вносили палыгорскит до конечной концентрации 100 г/л. Смесь тщательно перемешивали и высушивали путем распыления. Получено 185 г препарата с влажностью 7,96%. Концентрацию клеток в нем определяли после регидратации в течение трех часов путем высева в агаризованную среду. Количество жизнеспособных бактерий в 1 г препарата составляло  $1,8 \cdot 10^9$  клеток (табл.2).

Для сравнения использовали 2 л суспензии этих микроорганизмов с титром  $1,06 \cdot 10^9$  кл/мл, выращенной в отсутствие глинистых минералов. Перед распылительным высушиванием в нее эти минералы также не вносили. Получено 7,2 г сухого препарата, содержащего в 1 г  $2,8 \cdot 10^9$  жизнеспособных бактерий (табл.2). Таким образом, выход жизнеспособных клеток в сухом препарате, полученном с глинистым минералом был в 16,6 раза выше, чем в препарате, полученном без этих материалов.

Пример 2. Культуру микроорганизмов *Agrobacterium radiobacter* выращивали с глинистым минералом палыгорскитом в условиях, описанных в примере 1. В 2 л суспензии микроорганизмов с титром  $1,89 \cdot 10^9$  кл/мл вносили палыгорскит до его концентрации 20 г/л. Смесь тщательно перемешивали и высушивали путем распыления. Получено 30,5 г препарата, влажностью 8,7%. Концентрацию клеток в нем определяли вышеуказанным методом (пример 1). Количество жизнеспособных бактерий в 1 г препарата составляло  $4,5 \cdot 10^{10}$  клеток (табл.2).

Таким образом, выход жизнеспособных клеток в сухом препарате, полученном с глинистым минералом был почти в 7 раз выше, чем в препарате без этих минералов.

Пример 3. Культуру микроорганизмов *Agrobacterium radiobacter* выращивали с глинистыми минералами в

условиях, описанных в примере 1. В 2 л суспензии микроорганизмов, с титром  $1,89 \cdot 10^9$  кл/мл, вносили монтмориллонит до его концентрации 50 г/л. Смесь тщательно перемешивали и высушивали путем распыления. Получено 89 г препарата с влажностью 8,2%. Концентрацию клеток в нем определяли вышеуказанным методом (пример 1). Количество жизнеспособных бактерий в 1 г препарата составляло  $3,4 \cdot 10^{10}$  клеток (табл.2). Таким образом, выход жизнеспособных клеток в сухом препарате, полученном с глинистым минералом был в 15,1 раза выше, чем в препарате, полученном без этих минералов.

Пример 4. Культуру бактерий *Methylobacterium rubrum* выращивали в герметичных колбах объемом 750 мл на качалках в течение 2 сут при 30°C в питательной среде следующего состава (в г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,25;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 3Н<sub>2</sub>О - 0,25;  $\text{KNO}_3$  - 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,3;  $\text{NaCl}$  - 3,5;  $\text{CaCl}_2$  - 0,02;  $\text{FeCl}_3$  - 0,001, pH среды - 6,7-6,9.

Для этого в ряд колб вносили различные концентрации палыгорскита и монтмориллонита. В ряд других колб эти материалы не вносили. Колбы стерилизовали, после чего в них задавали по 50 мл питательной среды вышеприведенного состава, инокулированной данными бактериями. Колбы вакуумировали на 0,3 атм и вакуумированный объем заполняли метаном, создавая таким образом газовую смесь, необходимую для роста метанотрофных бактерий, содержащую 30% метана и 70% воздуха. Результат влияния этих минералов на рост метанотрофов учитывали по количеству клеток, определяемому путем посева из серийных десятикратных разведений на поверхность агаризованной среды (табл.3). Данные исследований свидетельствуют о значительном увеличении численности жизнеспособных бактерий в суспензии при их культивировании с глинистыми минералами по сравнению с контролем, где эти минералы не вносили.

В 2 л суспензии микроорганизмов с титром  $2,3 \cdot 10^9$  кл/мл, выращенной в присутствии 0,5 г/л палыгорскита дополнительно вносили этот минерал до его конечной концентрации 50 г/л (табл.4). Смесь тщательно перемешивали и высушивали путем распыления. Получено 82 г сухого препарата, содержащего в 1 грамме  $4,1 \cdot 10^{10}$  клеток жизнеспособных микроорганизмов.

Для сравнения в 2 л суспензии микроорганизмов с титром  $1,5 \cdot 10^8$  кл/мл, выращенной в отсутствие глинистых минералов, эти материалы дополнительно не вносили. Суспензию высушивали методом распыления. Получено 8,3 г препарата. Содержание в нем жизнеспособных бактерий *M.rubrum* составляло  $4,4 \cdot 10^9$  кл/г препарата (табл.4). Таким образом, суммарный выход жизнеспособных клеток в препарате, полученном при наличии глинистого минерала почти на порядок был выше, чем в отсутствие этого материала.

Таким образом, внесение глинистых минералов в культуральную жидкость позволяет заметно увеличить выход жизнеспособных клеток в сухом препарате микроорганизмов при их получении методом распылительного высушивания.

**Таблица 1**

**Влияние глинистых минералов на рост *Agrobacterium radiobacter***

№ п/п	Содержание глинистых минералов в среде культивирования	Содержание бактерий в культуральной жидкости	
		кл $\cdot 10^9$ /мл	%
1	Глинистые минералы не вносили	$1,06 \pm 0,1$	100,0
2	Палыгорскит, 10 г/л	$1,89 \pm 0,1$	178,6
3	Монтмориллонит, 10 г/л	$1,81 \pm 0,29$	171,5
4	Каолин, 10 г/л	$1,36 \pm 0,15$	128,6

Т а б л и ц а 2

Влияние глинистых минералов на выживаемость *Agrobacterium radiobacter* при распылительном высушивании

Наименование глинистого минерала	Концентрация глинистого минерала, г/л	Масса полученного препарата, г	Содержание жизнеспособных бактерий, кл/г
Пальгорскит	0	7,2	$2,8 \cdot 10^{10}$
	100,0	185,0	$1,8 \cdot 10^{10}$
	20,0	30,5	$4,5 \cdot 10^{10}$
Монтмориллонит	0	7,2	$2,8 \cdot 10^{10}$
	50,0	89,0	$3,4 \cdot 10^{10}$

Примечание. Масса суспензии бактерий до внесения глинистых минералов составляла 2 кг.

Т а б л и ц а 3

Влияние глинистых минералов на рост метанотрофных бактерий *Methylobomonas rubra*

Наименование глинистого минерала	Концентрация глинистого минерала, г/л	Содержание бактерий	
		кл/мл	%
Пальгорскит	0	$1,5 \cdot 10^8$	100,0
	0,2	$1,75 \cdot 10^8$	117,3
	0,5	$2,20 \cdot 10^8$	146,7
	1,0	$2,23 \cdot 10^8$	149,0
	2,0	$2,2 \cdot 10^8$	146,7
Монтмориллонит	0	$1,5 \cdot 10^8$	100,0
	0,2	$1,58 \cdot 10^8$	105,3
	0,5	$1,68 \cdot 10^8$	112,0
	1,0	$1,85 \cdot 10^8$	123,3
	2,0	$1,57 \cdot 10^8$	104,7

Т а б л и ц а 4

Влияние палыгорскита на выживаемость *Methylobacter rubra* при распылительном высушивании

Содержание глинистого минерала, г/л	Масса полученного препарата, г	Титр жизнеспособных бактерий в препарате, кл/г
0	8,3	$4,4 \cdot 10^9$
50,0	82	$4,1 \cdot 10^9$

П р и м е ч а н и е: Масса суспензии бактерий до внесения глинистого минерала перед высушиванием составляла 2 кг.