

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО**(12) Описание изобретения**
К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 2502145

(22) 25.07.2025

(46) Бюл. 231, 2026

(71) Институт проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук (TJ)

(72) Саттори И. (TJ); Абдуллоев А.О. (TJ); Махмудов К.Б. (TJ); Исмаев И.А. (TJ); Сохибов Ш.С. (TJ); Рахимов А.А. (TJ)

(73) Институт проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук (TJ)

(54) СПОСОБ ДЛИТЕЛЬНОГО СОХРАНЕНИЯ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММА CLOSTRIDIUM CHAUVOEI

(56)

1. Похиленко В. Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Изв. высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – №4 (12). – С. 99–121.

2. Патент СССР №1831498, C12N 1/04, 1993.

3. Саттори И. Эффективность контактно-адсорбционного метода высушивания при длительном хранении бактерии-антагониста *Bacillus subtilis* / И. Саттори, Т.М. Мирзоализода,

2

К.Б. Махмудов // Кишоварз. – 2022. – №3 (96). – С. 84–86.

4. Мустафина Э.Н. Способы хранения культур *Clostridium botulinum* / Э.Н. Мустафина, Т.Р. Мустафин, Н.С. Садыков, С.А. Юсупов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2017. – С. 27–30.

(57) Изобретение относится к ветеринарной микробиологии и биотехнологии. Способ обеспечивает длительное сохранение биологических свойств *Clostridium chauvoei* путем культивирования штамма на обогащенном МППБ до концентрации 5–6 млрд м.к./мл с последующей адсорбцией на стерильном бентоните в соотношении 1:10. В процессе инкубации при 37°C в течение 48 часов происходит переход вегетативных форм в споры, что позволяет сохранять патогенность и иммуногенность штамма в течение 3,5 лет при температурах 18–25°C или 4–8°C. Технический результат заключается в упрощении процесса сохранения штаммов за счет исключения стадии лиофилизации и использования доступного природного адсорбента.

Изобретение относится к ветеринарной микробиологии и биотехнологии, а именно к длительному сохранению биологических свойств коллекционных и производственных штаммов *Clostridium chauvoei*.

Одними из актуальных задач обеспечения эпизоотического благополучия животноводческих хозяйств являются выделение и идентификация возбудителей инфекционных болезней животных, подбор иммуногенных штаммов для производства ветеринарных биопрепаратов, причем особую значимость при коллекционировании патогенных микроорганизмов имеет долговременное хранение штаммов и передача их производству для изготовления вакцин и диагностикумов.

Главным биологическим свойством производственных штаммов является патогенность для восприимчивых сельскохозяйственных и лабораторных животных, которая определяет антигенную и иммуногенную активность вакцины. Поэтому изыскание эффективных методов длительного сохранения биологических свойств штаммов патогенов имеет научно-практическую значимость в микробиологии и биотехнологии.

В настоящее время штаммы микроорганизмов хранят в течение 6–12 мес. в нативном виде в жидких и плотных питательных средах под минеральным маслом, длительное время в замороженном состоянии при низких температурах и в высушенном виде при лиофилизации [1, 2].

Аналогичными методами хранения штаммов микроорганизмов в сухом виде являются адсорбция спорообразующих бактерий на различных носителях — почве, песке, бумаге, желатине, активированном угле [1,3]. В указанных способах не приведены данные о сроках хранения и результаты динамического исследования патогенности штаммов *Clostridium chauvoei* при хранении.

Известен контактно-сорбционный метод высушивания на бентоните *Bacillus subtilis* [3], которую 48 ч выращивают (37°C) в мясо-пептонном бульоне (МПБ), затем 48 ч при 50°C одновременно культивируют и высушивают бактериальную массу в обогащенном бентонитом МПБ. Указанный способ применяют для высушивания бактериальной массы при изготовлении пробиотика Субтилбен на основе непатогенной *Bacillus subtilis*, поэтому в результатах исследований приведены данные о бактерицидности пробиотика.

Прототипом заявленного изобретения является общепринятый способ длительного хранения патогенных штаммов клостридий, включающий культивирование бактерий на мясо-пептонном печеночном бульоне (МППБ) в течение 24 ч при температуре 37°C в анаэробных условиях и последующее лиофильное высушивание бактериальной массы с использованием защитных сред [4]. Недостатками этого способа являются его высокая стоимость, необходимость использования дорогостоящего лиофильного оборудования, трудоемкость

процесса подбора защитных сред для предварительной заморозки биомассы, а также риск снижения биологической активности штаммов в процессе дегидратации.

Целью предлагаемого изобретения является длительное сохранение патогенных свойств коллекционных и производственных штаммов для изготовления высокоантигенных и иммуногенных вакцин против эмфизематозного карбункула (эмкар) рогатого скота.

Поставленная цель достигается тем, что коллекционный штамм Ссh 33 TJ *Clostridium chauvoei*, выращенный (48 ч) на обогащенном белково-минеральными веществами МППБ до концентрации 5–6 млрд м.к./мл, адсорбируют на бентоните (1:10) во флаконах, закрытых ватными пробками, затем 48 ч инкубируют (37°C); после замены ватных пробок резиновыми адсорбированную культуру хранят при комнатной температуре (18–25°C) или в холодильнике (4–8°C) в течение длительного времени.

Сущность способа заключается в том, что при адсорбции вегетативных форм бульонной культуры штамма Ссh 33 TJ *Clostridium chauvoei* на бентоните обеспечивается их переход в спорую форму в максимальном объеме. В качестве адсорбента использовали бентонит месторождения «Каратаг» (Республика Таджикистан) для длительного сохранения биологических свойств спор *Clostridium chauvoei*.

Заявленный способ позволяет длительное время сохранять биологические свойства, в том числе патогенность штамма, исключает периодический пересев производственных штаммов и заражение лабораторных животных каждые 4–6 мес., предотвращает риск контаминации посторонней микрофлорой и сохраняет иммуногенную активность бактерии. Доступность (не требуется специальное оборудование) и экономичность разработанного способа обуславливают его широкое практическое применение в лабораториях коллекционных штаммов микроорганизмов и производственных отделах биопредприятий.

Заявителем не выявлены способы длительного сохранения патогенности штаммов *Clostridium chauvoei*, идентичные заявленному, что позволяет сделать вывод о соответствии изобретения условию «Новизна». Техническое решение характеризуется максимальным переходом бактерий в спорую форму, длительное время сохраняющую в носителе тинкториальные, морфологические, культуральные, биохимические и патогенные свойства, что соответствует «Изобретательскому уровню».

Практическое применение заявленного способа подтверждают следующие опыты.

Пример 1. Коллоидную фракцию бентонита (месторождение «Каратаг», Республика Таджикистан) по 100 г во флаконах стерилизовали (160°C) в сушильном шкафу в течение 1, 2, 3, 4 и 5 ч. соответствующие серии бентонитов засевали на: а) МПБ и мясо-пептонный агар (МПА) (24 ч культивировали при 37°C в аэробных условиях);

б) обогащенный МППБ (48 ч культивировали при 37°C в анаэробных условиях); в) агар Сабуро (4 сут инкубировали при 25°C в аэробных условиях). В пробах нестерилизованной и стерилизованных в течение 1, 2 и 3 ч серий бентонита наблюдали рост непатогенной микрофлоры в МПБ и МПА, который отсутствовал в пробах стерилизованных 4 и 5 ч серий. В посеянных на обогащенный МППБ пробах нестерилизованного и стерилизованных в течение 1, 2 и 3 ч серий бентонита также отмечен рост бактерий, отсутствовавший в пробах серий, стерилизованных в течение 4 и 5 ч. Грибы отсутствовали как в нестерилизованной, так и во всех стерилизованных пробах серий бентонита, посеянных на агар Сабуро. Учитывая полученные результаты, при адсорбции культуры штамма Cch 33 TJ *Clostridium chauvoei* использовали бентонит, стерилизованный (160°C) в сушильном шкафу в течение 4 ч.

Пример 2. Штамм Cch 33 TJ *Clostridium chauvoei* засеивали в обогащенный МППБ, 48 ч инкубировали (37°C) в анаэробных условиях до концентрации 5–6 млрд м.к./мл, после чего бактериальную массу смешивали с бентонитом в

соотношениях 0,5:10, 1:10, 2:10 и 3:10. Визуально наилучшей (однородной и некашицеобразной)

была консистенция смеси при соотношении компонентов 1:10.

Пример 3. Всушенную культуру штамма Cch 33 TJ *Clostridium chauvoei* каждые 6 мес. засеивали на обогащенный МППБ и 24–48 ч инкубировали (37°C) в анаэробных условиях. Установлено, что культуральные, тинкториальные, морфологические, биохимические и патогенные свойства культуры не изменяются в течение 3,5 лет.

Пример 4. Суточной бульонной культурой штамма *Clostridium chauvoei* каждые 6 мес. внутримышечно заражали 4 морские свинки. В течение 3,5 лет LD₅₀ культуры бактерии через 14–18 ч инфицирования составила 0,2 - 0,3 x 10⁹ м.к./мл.

Формула изобретения

Способ длительного сохранения патогенности штамма *Clostridium chauvoei*, включающий культивирование бактерий на мясо-пептонном печеночном бульоне (МППБ) в анаэробных условиях при температуре 37°C с последующим высушиванием бактериальной массы, отличающийся тем, что культивирование штамма проводят на МППБ, обогащенном белково-минеральными веществами, до концентрации 5–6 млрд м.к./мл, полученную бульонную культуру

адсорбируют на стерильном бентоните в соотношении 1:10 во флаконах, закрытых ватными пробками, инкубируют в течение 48 ч при температуре 37°C до перехода бактерий в спорую форму, после чего ватные пробки заменяют на резиновые и обеспечивают хранение адсорбированной культуры при температуре 18–25°C или 4–8°C.

Компьютерный набор: Газиев М.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		