



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **390**

(51) МПК 7 A01N63/00, C12N 1/20

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

(21) 03000794

(22) 18.07.2003

(46) Бюл. 38, 2005

(71) Сатторов И.Т.

(72) Сатторов И.Т.(ТJ); Джуманкулов Х.Д. (ТJ); Сангинов Б.С. (ТJ); Султонова М.Х.(ТJ); Махмудов К.Б.(ТJ); Турдиев Ш. (ТJ); Каландаров З. (ТJ); Саидов Ш. (ТJ); Носиров С. (ТJ)

(73) Сатторов И.Т.(ТJ); Джуманкулов Х.Д. (ТJ)

(56) 1.RU 2099947, C1, 27.12.1997

2.RU 2129375, C1, 27.04.1999

3.GB 1501563, 15.02.1978

4.KR 9603924, 23.03.1996

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО БИОПРЕПАРАТА СУБТИЛБЕН

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству бактериальных препаратов на основе *Bacillus Subtilis* применяющихся в сельском хозяйстве – растениеводстве и ветеринарной медицине.

Целью изобретения является повышение эффективности способа.

Разработанный способ получения препарата субтилбен из бактерий рода *Bacillus*, включающий культивирование на питательной среде, состоящей из минеральных солей, пептона, углеводов, и отделение биомассы, отличающийся тем, что биомассу *Bacillus subtilis* смешивают с наполнителем – бен-тонито-пектовой смесью в соотношении 9:1 – в количестве 20-30% и высушивают нелиофильным способом при температуре 60 – 65° С в течение 48 ч.

Разработанный способ дает возможность избежать дорогостоящего этапа по лиофильному высушиванию бактериальной массы, увеличить выход биомассы и повысить ее активность.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству бактериальных препаратов на основе *Bacillus Subtilis*, применяющихся в сельском хозяйстве – растениеводстве и ветеринарной медицине

Известен способ получения биопрепарата из бактерий рода *Bacillus Subtilis* (1), включающий засев питательной среды маточной культурой, жидкостное культивирование в среде, содержащей минеральные соли, пептон, углеводы и отделение целевого продукта; состоящего из культуральной жидкости со споровой биомассой, на 14 сутки инкубации. Препарат используется в жидкой форме.

Недостатками указанного способа являются:

-длительность культивирования 14 суток;

-низкий выход биомассы -1,6 - 3 млрд. живых клеток в форме спор в 1 мл;

-недостаточно длительный срок хранения - 4 месяца.

-непригодность жидкой формы препарата для заблаговременной (за 2-3 месяца до посева) обработки семян хлопчатника и других культур.

Известен способ получения биопрепарата из бактерий рода *Bacillus Subtilis* (2), включающий засев питательной среды маточной культурой, жидкостное культивирование (12-16ч.) в среде, содержащей минеральные соли, пептон, углеводы и отделения целевого продукта, содержащего культуральную жидкость со споровой биомассой. Полученная культуральная жидкость содержит 24 – 26 млрд. микробных клеток (м.к.) в мл (70-100% спор). К полученной биомассе добавляют стабилизатор биомассы (гуми 0,5-2 % или сульфит натрия 2-6%), что обеспечивает сохранение количества живых колониеобразующих клеток в течение 6-8 месяцев. Культуральная жидкость, содержащую споровую биомассу штамма *acillus Subtilis* 26Д и стабилизатор биомассы и используют в качестве бактериального препарата фитоспорин в жидкой форме (3).

Недостатками указанного способа являются:

- низкий выход биомассы - 24-26 млрд. живых клеток в форме спор 1 мл;
- недостаточно длительный срок хранения: в течение 6-8 месяцев;
- непригодность жидкой формы препарата для заблаговременной (за 2-3 месяца до посева) обработки семян хлопчатника и других культур.

Применяется способ получения препарата из штамма *Bacillus Subtilis* 26Д (4), включающий засев питательной среды маточной культурой, жидкостное культивирование в среде, содержащей минеральные соли, пептон, углеводы и отделение целевого продукта, содержащего культуральную жидкость со споровой биомассой (24 – 26 млрд м.к./мл). Препарат содержит лиофильно высушенные живые клетки и споры *Bacillus Subtilis* и наполнитель (белково-сахароза-желатиновую смесь).

Препарат выпускают во флаконах и ампулах.

Недостатками способа, принятого за прототип, являются:

- необходимость приобретения и обслуживания дорогостоящих и энергоемких аппаратов для сушки биомассы лиофильным способом;
- неудобства использования флаконов и ампул с препаратом при приготовлении больших его объемов для обработки семян хлопчатника и других культур, а также массовых обработок животных;
- препарат не содержит минеральных и растительных адсорбентов в качестве наполнителя, способствующих сохранению жизнедеятельности бактерий в неблагоприятных условиях среды и усиливающих его антимикробную активность.

Цель изобретения – разработать способ получения препарата из бактерий рода *Bacillus* с высоким выходом биомассы в форме порошка без использования лиофильной сушки, менее дорогостоящего, технологически удобного для применения.

Поставленная цель достигается получением биомассы *Bacillus subtilis* (штамм 26Д ТаджНИВИ 09) путем культивирования на питательной среде, следующего состава, %: пептон ферментативный - 9,0 – 10,0; питательный бульон – 9,0 – 10,0; картофельный крахмал – 10,0 – 12,0; глюкоза - 8,0 - 9,0; хлорид натрия – 0,1 - 0,15; агар-агар – 8,0-9,0; вода - остальное. Засев производят маточной экспонсиальной культурой в количестве $2-3 \times 10^9$ м.к./мл. Культивирование осуществляют в течение 48 ч при температуре 37° С. К полученной биомассе добавляют наполнитель-бентонит - пектиновую смесь в соотношении 9:1 - в количестве 20-30% и высушивают нелиофильным способом при температуре 60-65°С в течение 48 ч. Полученный порошок, состоящий из живых микробных клеток *Bacillus subtilis* и наполнителя, содержащий 60 – 70 млрд м.к./г (90 – 100% спор), используется в качестве препарата субтильбен.

Пример 1. Биомассу *Bacillus subtilis* (штамм 26Д Тадж НИВИ 09) получали путем культивирования в питательной среде следующего состава %: пептон ферментативный – 9,0 – 10,0; питательный бульон – 9,0 - 10,0; картофельный крахмал – 10,0 – 12,0; глюкоза 8,0-9,0; хлорид натрия – 0,1-0,15; агар-агар 8,0-9,0; вода - остальное. Засев производят маточной экспонсиальной культурой в количестве $2-3 \times 10^9$ м.к./мл. Культивирование осуществляли в течение 48 ч при температуре 37 С. К полученной биомассе добавляли наполнитель - бентонит - пектиновую смесь в соотношении 9:1 - в количестве 20% и высушивали нелиофильным способом при температуре 60 С в течение 48 часов. Контроль за ростом культуры проводили путем отбора проб через каждые 2 часа и определением концентрации микробных клеток в камере Горяева; количество колониеобразующих клеток (КОК) определяли высевом на плотные питательные среды, наличие спор - в мазках культуры, окрашенных по Граму. Готовый препарат измельчали в порошок и расфасовывали в бумажные пакеты.

Результаты исследования показали, что количество КОК составило 70 млрд. м.к./г, количество живых клеток в 1 г препарата достигло 96 - 97% (85-100% спор).

Пример 2. Культивирование проводили как в примере 1, при этом в биомассу добавляли бентонитопектиновый наполнитель (9:1) в количестве 30% и высушивали препарат в сушильном шкафу при температуре 60° С в течение 48 ч.

Результаты исследования показали, что количество КОК составило 68 млрд. м.к./г, количество живых клеток в 1г препарата достигло 94 - 96% (95-100% спор).

Пример 3. Культивирование проводили как в примере 1, при этом в биомассу добавляли бентонитопектиновый наполнитель (9:1) в количестве 20% и высушивали препарат в сушильном шкафу при температуре 65° С в течение 48 ч.

Результаты исследования показали, что количество КОК составило 63 млрд. м.к./г, количество живых клеток в 1 г препарата достигло 94-96% (94-100% спор).

Пример 4. Культивирование проводили как в примере 1, при этом в биомассу добавляли бентонитопектиновый наполнитель (9:1) в количестве 30% и высушивали препарат в сушильном шкафу при температуре 65° С в течение 48 ч.

Результаты исследования показали, что количество КОК составило 60 млрд. м.к./г, количество живых клеток в 1 г препарата достигло 92-94% (95-100% спор).

Пример 5. Культивирование проводили как в примере 1, при этом в биомассу добавляли бентонитопектиновый наполнитель (9:1) в количестве 30% и высушивали препарат в сушильном шкафу при температуре 70° С в течение 48 ч.

Результаты исследования показали, что количества КОК составило 28 млрд м.к./г, количество живых клеток в 1 г препарата достигло 45% (100% спор).

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что добавление бентонитопектинового наполнителя (9:1) в количестве 20 - 30% к биомассе и сушка смеси в сушильном шкафу при температуре 60 -

65° С в течение 48 ч является наиболее эффективным.

Антибактериальную активность препарата субтилбен, приготовленного, как в примере 1, изучали по отношению к тест-культурам в жидкой питательной среде методом серийных разведений (5).

Минимальное количество препарата, дающее полную задержку роста тесткультуры, соответствовало наименьшей его концентрации, по нему определялась чувствительность тест-микробов к препарату. Результаты опытов оценивали микроскопически путем исследований мазков культуральной жидкости, окрашенных по Граму.

Опыты проводили в трех повторениях. Результаты представлены в таблице.

Установлено, что препарат обладает высокой бактерицидной активностью по отношению к тест-микробам. Минимальное количество препарата, дающее полную задержку роста и развития тест-микробов, составило 15,1 – 31,2 млн м.к. в мл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения лечебно-профилактического биопрепарата путем смешивания биомассы штамма *Vaccillus subtilis*, полученной после культивирования на питательной среде, с наполнителем с последующим высушиванием, **отличающийся тем, что** в качестве наполнителя используют бентонито-пектиновую смесь, взятую в соотношении 9:1 и вводимую в количестве 20-30 мас.%, высушивание биомассы штамма *Vaccillus subtilis* 26Д ТаджНИВИ 09 осуществляют при температуре 60-65 °С в течение 48 ч.

Таблица

Бактерицидная активность субтилбена по отношению к тест-микробам

Препарат	Бактерии	Количество микробных клеток в препарате, млн/мл									
		500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	Контроль
Субтилбен	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Salmonella dublin</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Pasterella multosida</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Verticillium dahliae</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Примечание:

- - отсутствие роста тест-микробов,

+ - наличие роста бактерий.