

Изобретение относится к биотехнологии, а именно, к производству бактериальных препаратов. Сыпучие бактериальные препараты обладают рядом преимуществ перед суспензиями микроорганизмов и другими формами готового продукта. Они заключаются в удобстве хранения сыпучих препаратов, транспортирования, а также их использования.

Широко распространенным способом получения сыпучих бактериальных препаратов является их изготовление на основе торфа (А. с. СССР №540852, МКИ С 05 F 11/08, опубл. 30.12.1976). Однако, учитывая различия в происхождении торфов, степени их метаморфизма и свойствах, применение данных субстратов для приготовления бактериальных препаратов зачастую не позволяет получать эффективные препараты. К тому же, очень часто возникают значительные сложности со стерилизацией торфа, поскольку термическая обработка может приводить к непрогнозируемому ухудшению его качества, а радиационная стерилизация данного материала является дорогостоящей и труднодоступной.

Достаточно распространенным способом получения сыпучих бактериальных препаратов является распылительное высушивание микробных суспензий после их смешивания с защитными средами. Известен способ получения бактериальных препаратов путём распылительного высушивания (Ас. СССР № 1616990, МКИ С12N 1/02, опубл. 30.12.90), отличающийся тем, что с целью увеличения количества жизнеспособных клеток, микроорганизмы перед высушиванием их суспензии сначала смешивают с глинистым минералом палыгорскитом, а затем с сухим молоком. Однако применение сухого молока в качестве защитной среды, а также энергоёмкого распылительного высушивания значительно удорожает процесс получения бакпрепаратов.

Предложен способ защиты и консервирования микроорганизмов глинистыми минералами, предусматривающий смешивание водных суспензий микроорганизмов и глин и последующее удаление избытка влаги до получения состава, в котором клетки покрыты слоем глины (Заявка Франции №2394606, МКИ С12K 1/08, А01 15/00, опубл. 17.07.87). Недостатком данного способа является необходимость многократного отмывания клеток микроорганизмов перед их смешиванием с глинистыми минералами.

Описан способ получения бактериального препарата, в котором для его приготовления суспензию микроорганизмов смешивают с прокаленным глинистым минералом, а затем полученную смесь высушивают под вакуумом (Заявка Франции №2592892, МКИ С12 №1/20, опубл. 17.07.87). Такой подход обеспечивает высокий выход жизнеспособных клеток в сыпучем препарате. Однако, вакуумное высушивание препарата значительно удлиняет время его получения и увеличивает стоимость готового продукта.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому является способ приготовления препаратов клубеньковых бактерий, основанный на смешивании суспензии этих микроорганизмов с химически инертным пористым материалом при соотношении 0,5-1,0 и последующем высушивании на воздухе в асептических условиях в течение 2-10 дней (Пат. ЕПВ №0203708.1986). Однако порошковидный препарат жизнеспособных бактерий не всегда удобен в применении, а длительный срок его высушивания значительно усложняет технологию получения препарата.

В основу изобретения поставлена задача создания гранулированного бактериального препарата, в котором в качестве наполнителя используют стерильные глинистые материалы, чем обеспечивается возможность гранулирования композита, содержащего клетки микроорганизмов и за счет их взаимодействия с данными материалами достигается сохранение жизнеспособности бактерий в удобном для применения готовом препарате низкой стоимости.

Поставленная задача решается тем, что в процессе получения гранулированных бактериальных препаратов, включающем выращивание культуры микроорганизмов, смешивание её суспензии с наполнителем и гранулирование полученной массы, согласно изобретению, в культурную жидкость, содержащую клубеньковые бактерии, вносят стерильные глинистые материалы, которые задают в два приёма в конечном массовом отношении к суспензии микроорганизмов 1,2-2,0:1,0. На первом этапе глинистые материалы вносят в пределах 0,1-2,0% от массы суспензии; основную часть глины задают через 15-20 мин. После внесения первой порции. Полученную массу перемешивают и гранулируют известным методом. Для удаления влаги с поверхности полученных частиц и их подсушивания гранулы приводят в контакт со стерильными порошковидными высушенными глинистыми материалами. Затем препарат подсушивают на воздухе в течение часа и расфасовывают. Сущность изобретения иллюстрируется следующими примерами.

ПРИМЕР 1.

Культуру бактерий *Bradyrhizobium japonicum* штамм 634 выращивали в среде с гороховым отваром (100 г гороха на 1 л) следующего состава (в г/л): KH_2PO_4 -0,5; K_2HPO_4 * $3\text{H}_2\text{O}$ -0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0,5; MgSO_4 * $7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCO_3 -0,1; дрожжевой экстракт - 1,0; маннит - 10,0; pH среды 6,3-6,5. Для этого в 3 колбы Эрленмейера, объемом 0,7 л вносили по 50 мл среды вышеприведенного состава, инокулированной данными микроорганизмами, полученными при смыве их газона со скошенной агаризованной среды в микробиологических пробирках.

Культуру микроорганизмов выращивали при 28-30° С в течение трёх суток. В 150 мл суспензии бактерий вносили 7,5 г порошковидного стерильного глинистого минерала монтмориллонита. Смесь медленно взбалтывали в течение 15 мин. Для улучшения контакта бактерий с частицами глинистого материала. После этого в смесь вносили 202,5 г порошковидного стерильного монтмориллонита до получения густой массы. Полученную смесь перемешивали, гранулировали известным методом, постоянно припудривая поверхность гранул сухим стерильным глинистым материалом для отбора влаги с поверхности гранул. Гранулы досушивали на воздухе в течение часа, отсеивали от порошковидных частиц и стерильно расфасовывали. Получено 345 г гранулированного препарата влажностью 27,6% (часть подготовленной массы терялась в емкости для смешивания и грануляторе).

Численность жизнеспособных бактерий в образцах определяли методом десятикратных разведений с последующим высевом 0,1 мл образца соответствующего разведения на поверхность агаризованной среды вышеприведенного состава в чашках Петри и учётом количества выросших колоний после 10 суток культивирования при температуре 28-30° С. Для приготовления десятикратных разведений из образцов гранулированного препарата 10 г этого препарата вносили в 90 мл стерильной водопроводной воды и реактивировали путем встряхивания на качалке в течении двух часов.

Численность жизнеспособных клубеньковых бактерий в 1 мл исходной суспензии составляла $1,71 \cdot 10^9$. В 150 мл суспензии содержалось $2,56 \cdot 10^{11}$ жизнеспособных клеток, а их титр в 1 г гранулированного препарата составлял $0,52 \cdot 10^9$ клеток. Их количество в 345 г препарата достигало $1,79 \cdot 10^{11}$. Таким образом, выход жизнеспособных клеток в гранулированном препарате с монтмориллонитом составил 69,9%.

ПРИМЕР 2.

Бактерии *Bradyrhizobium japonicum* 634 выращивали в условиях, описанных в примере 1. В 5 колб вносили по 150 мл суспензии, полученной при выращивании этих микроорганизмов. В разные колбы с этой суспензией добавляли стерильный порошковидный глинистый минерал палыгорскит в количестве 0,15; 7,5; 15,0; 30,0 г. В один из вариантов глинистый материал не вносили. Для улучшения контакта бактерий с частицами минерала содержимое колб медленно перемешивали в течении 15 мин. После этого во все колбы вносили новые порции данного минерала до его конечного содержания 225 г (табл.). Смесь тщательно перемешивали, гранулировали известным методом, постоянно припудривая поверхность полученных гранул сухим стерильным порошком палыгорскита для отбора влаги с поверхности гранул. Их досушивали на воздухе в течении часа, отсеивали от порошковидных частиц и расфасовывали.

Численность жизнеспособных бактерий в суспензии микроорганизмов и препаратах определяли по методу, описанному в примере 1. Количество жизнеспособных бактерий в исходной суспензии составило $1,71 \cdot 10^9$ кл/мл. Следовательно, в 150 мл суспензии содержалось $2,56 \cdot 10^{11}$ клеток. Численность жизнеспособных бактерий в различных образцах препарата приведена в таблице. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при однократном внесении палыгорскита в суспензию микроорганизмов выход жизнеспособных клеток в гранулированном препарате составлял лишь около 10% от их численности в исходной суспензии. Если же глинистые материалы вносили в два приёма (табл.), что улучшало взаимодействие клеток с частицами минерала, выход жизнеспособных бактерий существенно возрастал. При внесении на первом этапе 5% палыгорскита выход жизнеспособных бактерий в готовом препарате достигал максимальных значений и составлял 41,8%.

Таким образом, внесение глинистого минерала в суспензию микроорганизмов в два приёма: на первом этапе в пределах 0,1-20%, а на втором – до получения гранулированной массы, способствует контактному взаимодействию бактерий с частицами минерала, предохраняет клетки от действия неблагоприятных факторов окружающей среды и повышает выход жизнеспособных микроорганизмов.

ПРИМЕР 3.

Бактерии *Bradyrhizobium japonicum* 634 выращивали в условиях, описанных в примере 1. В 150 мл полученной суспензии вносили 7,5 г стерильного порошковидного палыгорскита. Смесь медленно перемешивали в течении 15 мин. для улучшения контакта микроорганизмов с частицами глинистого минерала. Затем туда вносили 172,5 г данного минерала. Смесь тщательно перемешивали, гранулировали известным методом, постоянно припудривая поверхность гранул сухим стерильным порошковидным палыгорскитом для отбора влаги с поверхности этих гранул. Их подсушивали на воздухе в течении одного часа, отсеивали от порошковидных частиц и расфасовывали.

Получено 271 г гранулированного препарата. Численность жизнеспособных клеток в исходной суспензии и готовом препарате определяли по методу, описанному в примере 1. В исходной суспензии количество жизнеспособных бактерий составляло $2,5 \cdot 10^9$ кл/мл. Следовательно, в 150 мл суспензии содержалось $3,75 \cdot 10^{11}$ жизнеспособных клеток. В гранулированном препарате титр жизнеспособных бактерий составлял $0,39 \cdot 10^9$ кл/г. В 271 г препарата их содержание достигало $1,06 \cdot 10^{11}$ кл/г. Выход жизнеспособных бактерий в гранулированном препарате с палыгорскитом составил 28,3%.

Полученный результат свидетельствует о том, что применение глинистого материала палыгорскита в весовом соотношении к суспензии бактерий 1,2:1,0 позволяет получить гранулированный препарат клубеньковых бактерий с выходом жизнеспособных бактерий в нём 28,3% от их содержания в суспензии.

Таким образом, использование глинистых минералов палыгорскита и, особенно, монтмориллонита позволяет получить гранулированный препарат *Bradyrhizobium japonicum* с высоким содержанием в нём жизнеспособных бактерий.

Таблица

Зависимость качества препарата *Bradyrhizobium japonicum* от количества глинистого минерала палыгорскита, вносимого в суспензию бактерий на первом и втором этапе подготовки материала к гранулированию

Характеристика препарата	Количество палыгорскита (г), вносимого в суспензию бактерий на первом (числитель) и втором (знаменатель) этапе подготовки материала
--------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	0 /225,0	0,15 /225,0	7,5 /217,5	15,0 /210,0	30,0 /190,0
Численность жизнеспособных препаратов, кл/г	$0,9 \cdot 10^8$	$0,19 \cdot 10^9$	$0,36 \cdot 10^9$	$0,30 \cdot 10^9$	$0,29 \cdot 10^9$
Масса полученного препарата, г	295	302	298	300	297
Общая численность бактерий в препарате	$0,26 \cdot 10^{11}$	$0,57 \cdot 10^{11}$	$1,07 \cdot 10^{11}$	$0,90 \cdot 10^{11}$	$0,86 \cdot 10^{11}$
Выход жизнеспособных бактерий в препарате, %	10,2	22,3	41,8	35,2	33,6

Примечания:

1. Объем использованной суспензии - 150 мл;
2. Титр жизнеспособных бактерий в исходной суспензии - $1,71 \cdot 10^9$;
3. Часть массы, подлежащей гранулированию, остается на используемом оборудовании.
