



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 11/00 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2020143507, 28.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2020

Дата регистрации:
08.09.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2020

(45) Опубликовано: 08.09.2021 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Токтаревой
Т.М.

(72) Автор(ы):

Шайдорова Галина Михайловна (RU),
Круть Ульяна Александровна (RU),
Радченко Александра Игоревна (RU),
Кузубова Елена Валерьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 5695541 A1, 09.12.1997. RU
2412913 C2, 27.02.2011. RU 2370525 C2,
20.10.2009. SU 922142 A1, 23.04.1982. RU 2318736
C2, 10.03.2008.

(54) Способ иммобилизации микроорганизмов на монтмориллонитовые глины

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой способ иммобилизации микроорганизмов на монтмориллонитовые глины. Способ включает смешивание предварительно обогащенной и активированной 10%-ной соляной кислотой монтмориллонитовой глины с биологическим материалом в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. Причем монтмориллонитовую глину после активации промывают очищенной дистиллированной водой до нейтральной среды, сушат при температуре не более 105°C и измельчают на шаровой мельнице до размеров частиц не более 10 мкм; а биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. предварительно заливают 0,05 М трис-гидрохлорида буферным раствором с pH 7,5 и перемешивают, причем при перемешивании смесь постепенно нагревают до

45°C в течение 5 минут, далее охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют, после чего сливают супернатант и к остатку обработанной биомассы в виде L-формы *Lysobacter* sp. при постоянном механическом перемешивании постепенно добавляют измельченную глину в соотношении носитель : биомасса, равном 1:(2-4), при температуре 25°C; смесь тщательно перемешивают в течение не менее 40 минут и затем подвергают лиофильной сушке при температуре минус 40-45°C в течение 24 часов до уровня 3-7% влажности композиции. Изобретение позволяет осуществить продление срока хранения бактериальных клеток *Lysobacter* sp. на носителе из монтмориллонитовой глины, с возможностью обеспечения восстановления их активности при нанесении на раневую поверхность. 1 з.п. ф-лы, 1 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 11/00 (2021.05)

(21)(22) Application: **2020143507, 28.12.2020**

(24) Effective date for property rights:
28.12.2020

Registration date:
08.09.2021

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2020**

(45) Date of publication: **08.09.2021** Bull. № 25

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):

**Shajdorova Galina Mikhajlovna (RU),
Krut Ulyana Aleksandrovna (RU),
Radchenko Aleksandra Igorevna (RU),
Kuzubova Elena Valerevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR IMMOBILIZING MICROORGANISMS ON MONTMORILLONITE CLAYS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and is a method for immobilizing microorganisms on montmorillonite clays. The method includes mixing pre-enriched and activated 10% hydrochloric acid montmorillonite clay with biological material in the form of biomass of microorganisms *Lysobacter* sp. Wherein, after activation, montmorillonite clay is washed with purified distilled water to a neutral medium, dried at a temperature of no more than 105°C and ground in a ball mill to a particle size of no more than 10 mcm; and biological material in the form of biomass of microorganisms *Lysobacter* sp. pre-fill with 0.05 M tris-hydrochloride buffer solution with pH 7.5 and mix, wherein, with stirring, the mixture is gradually heated to 45°C for 5 minutes, then cooled to room

temperature and centrifuged, after which the supernatant is decanted and to the remainder of the treated biomass in the form of L-form *Lysobacter* sp. with constant mechanical stirring, the crushed clay is gradually added in the ratio of the carrier : biomass equal to 1:(2-4) at a temperature of 25°C; the mixture is thoroughly mixed for at least 40 minutes and then freeze-dried at a temperature of minus 40-45°C for 24 hours to a level of 3-7% moisture content of the composition.

EFFECT: invention allows extending the shelf life of bacterial cells of *Lysobacter* sp. on a carrier made of montmorillonite clay, with the possibility of ensuring the restoration of their activity when applied to the wound surface.

2 cl, 1 tbl, 5 ex

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в сельском хозяйстве для получения средства для лечения ран у животных.

В настоящее время известны многочисленные способы иммобилизации микроорганизмов и клеток. Для иммобилизации применяют различные носители: гели, Са-альгинатный гель, n-алканы с C14-C16, природные сорбенты. Но все описанные способы имеют один большой недостаток они преимущественно применяются для очистки сточных вод или для очистки водной среды от загрязнения нефтепродуктами.

Известен способ иммобилизации клеток путем смешения клеток с гелем, отличающийся тем, что, с целью удлинения сроков сохранения жизнеспособности клеток млекопитающих, взвесь клеток смешивают с водным раствором, содержащим метилцеллюлозу 0,3 - 1,5%, альгинат натрия 0,2 - 1% и галактан сульфата 0,1 - 0,5%, в соотношении 1 : (1 - 4), затем полученную смесь смешивают с коллагеном, взятым в количестве 0,3 - 1,5% от массы образуемого геля. (патент SU № 1 264 575 A1 от 1984.10.23)

Известен способ иммобилизации клеток микроорганизмов с β -тирозиновой активностью путем включения их в гель, иммобилизацию приводят в присутствии стабилизатора - ацетата аммония или пирувата натрия или тирозина, при этом в качестве геля используют полиакриламидный гель, а из микроорганизмов используют штамм *Citrobacter reund* №62. Иммобилизацию клеток проводят в фосфатном буфере рН 7-8 с добавлением ацетата аммония, либо в ацетатном буфере при рН 8. В буфере смешивают суспензию клеток, растворы акриламида и метиленбисакриламида, тетраметиленамина и персульфата аммония. Реакционный сосуд погружают в баню со льдом. Полимеризация заканчивается через минуту. Блок полученного полиакриламидного геля с включенными клетками протирают через полиэтиленовое сито с размером пор 1*1 мм и отмывают от свободных клеток. В гель включается 89% клеток (патент SU 922142 A1 от 1982.04.23).

Известен способ получения биопрепарата для очистки водной среды от загрязнения нефтепродуктами. Способ получения биопрепарата заключается в том, что вещество носителя, вещество-фактор роста микроорганизмов и биомассу микроорганизмов-нефтедеструкторов, иммобилизованную посредством рассосредоточения биомассы микроорганизмов-нефтедеструкторов в массе вещества носителя физически соединяют с веществом носителя. В качестве вещества носителя применена композиция из Са-альгинатного геля, n-алканов с C14-C16 и вещества-фактора роста микроорганизмов. Иммобилизацию микроорганизмов-нефтедеструкторов осуществляют посредством рассосредоточения биомассы микроорганизмов-нефтедеструкторов в массе вещества носителя с физическим соединением их с веществом носителя, для чего приготавливают 1% водную смесь с альгинатом натрия (например, в количестве 100 мл для упомянутого количества суспензии биомассы), тщательно ее перемешивают и выдерживают в течение 2-3 часов для завершения абсорбции фрагментами альгината натрия. К полученной таким образом смеси с альгинатом натрия добавляют факторы роста, например, кукурузный экстракт в количестве 10 г на 100 мл смеси. Физическое соединение микроорганизмов-нефтедеструкторов с веществом носителя осуществлено посредством образования капель из смеси суспензированной биомассы с ингредиентами композиции вещества носителя и полимеризации капель с образованием гранул в водном растворе, содержащем ионы Са. Гранулы фильтруют, промывают и помещают в физиологический раствор. (патент РФ №2255052 от 2003.01.17)

Известен способ получения биосорбента, заключающийся в иммобилизации в гидрофобный сорбент нефти биомассы штаммов микромицета *Fusarium lateritium* НК-204 или *Gliocladium deliquescens* НК-205 или *Gliocladium deliquescens* НК-206 или

консорциума этих штаммов, посредством обрастания мицелием грибов сорбента, помещенного на питательную среду. Далее полученный препарат сушат. Сорбент выполнен из гидрофобного сорбента нефти на основе торфа. Мицелий грибов составляет 20 - 50% по сухому весу. (патент RU (11) №2299181, №2318736, №2299181 от 2005.08.03)

5 Известен способ получения биосорбента, включающий иммобилизацию на нефтяном гидрофобном сорбенте дрожжевых грибов *Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Pichia guilliermondii* и культур бактерий *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter* sp. в количестве от 10 до 50% (по сухому весу) посредством обрастания мицелием грибов сорбента с последующей сушкой на воздухе. (патент RU №2318736 от 2006.02.10)

10 Известен способ иммобилизации клеток микроорганизмов в гидрофобный олеофильный сорбент, заключающийся в смешивании двух аэрозолей до заданной степени насыщения сорбента биоагентом. Первый аэрозоль состоит из газовой среды, в которой во взвешенном состоянии находятся частицы сорбента. Второй аэрозоль состоит из газовой среды, в которой во взвешенном состоянии находится смесь или
15 масла, или нефтепродукта и культуральной жидкости с биоагентом. Частицы сорбента имеют размер - $1 \div 3$ мм в диаметре. Размер капель масляного или нефтяного аэрозоля $15 \div 25$ мкм. Капли масляного или нефтяного аэрозоля попадают на поверхность и в поры гидрофобного сорбента, обеспечивая быстрый контакт и внедрение микробных
20 клеток в разветвленную структуру гидрофобного сорбента. Процесс иммобилизации микробных клеток, содержащихся в масле или в нефти, выполняется в камере, где потоки сорбента и эмульсии подаются с заданной интенсивностью, температурой, давлением. Иммобилизацию продолжают до содержания микробных клеток в сорбенте не менее 10⁹ живых клеток на 1 г сорбента. Эта величина определена расчетно и
25 обеспечивается в производстве посредством забора проб и последующего лабораторного контроля. (патент РФ № 2420579 С2 от 2009.08.11)

Известен способ получения композиции, содержащей высушенные бактерии, который предусматривает культивирование одного или нескольких видов живых бактерий; смешивание культивируемой бактерии с одним или несколькими носителями; обработку
30 бактерии импульсными электромагнитными полями 2 мВ/см при 50 Гц и 55 В; инкубирование смеси культура:носитель в течение по крайней мере приблизительно 6 ч и сушку бактерии таким образом, чтобы снизить уровень влажности до величины приблизительно от 1 до приблизительно 6 мас.%.

Согласно данному изобретению предпочтительные носители представляют собой один или несколько из следующих: носитель из цеолита, носитель из глины, природное
35 соединение кремния с естественным содержанием воды, сходным с конечным содержанием влаги в смеси культура:носитель после сушки, как правило, в диапазоне от 3 до 7,5% (мас./мас.). Культивируемую бактерию и носитель смешивают таким образом, что соотношение культуры и носителя составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5. Обработку РЕМФ (импульсными электромагнитными полями)
40 проводят на одной или нескольких следующих стадиях: в ходе культивирования бактерии; в ходе смешивания культивируемой бактерии с носителем; после смешивания культивируемой бактерии с носителем; в ходе инкубации смеси культура:носитель; в течение высушивания смеси культура:носитель; в любое время после нанесения указанной смеси на семя или компонент семени; в любое время после высушивания
45 смеси культура:носитель; в любое время после повторной гидратации высушенной смеси культура:носитель.

Предпочтительно, микроорганизм и/или смесь культура микроорганизма:носитель сушат комнатным воздухом в лотках или сходных контейнерах. Предпочтительно,

сушку комнатным воздухом проводят при температуре приблизительно 10-30°C, как правило, приблизительно 20-24°C, и при относительной влажности менее чем 75%, предпочтительно, приблизительно 30-60%, более предпочтительно, приблизительно 32,5-35%. При сушке комнатным воздухом высушивание может занимать от 1 до 5 5 суток, предпочтительно, от 1 до 4 суток, приемлемо, 3-4 суток. Соответственно, в ходе сушки комнатным воздухом для выживания микроорганизма может быть полезно наличие в атмосфере ионов Ca^{2+} . В качестве еще одной альтернативы сушку можно проводить помещением смеси культура: носитель в контейнер, например, контейнер 10 Milli-Wrap^{RTM}, где контейнер допускает испарение влаги.

Уровень влаги постепенно снижают до величины приблизительно от 1% до приблизительно 6% (мас./мас.).

Стадию сушки можно проводить в нестерильных условиях.

Высушенный продукт можно измельчать с использованием мельницы с воздушным сепаратором до конечного размера частиц приблизительно от 0,1 до приблизительно 150 15 микрон.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления смесь культура: носитель можно инкубировать при приблизительно 10-15°C и при содержании влаги приблизительно 18-33% (масса во влажном состоянии) с последующей сушкой при 20°C над насыщенным хлоридом кальция в течение 3-4 суток при обеспечении относительной 20 влажности приблизительно 32,5% или с последующей быстрой сушкой в течение менее чем 24 часов. Содержание влаги в смеси культура:носитель можно снижать до величины приблизительно от 4 до приблизительно 7%.

Полученная композиция может быть использована для нанесения на семена или 25 другой репродуктивный материал растения, для введения в среду для роста растений, для очистки сточных вод и/или очистки химических/биологических отходов, для очистки загрязненных почв, для введения приемлемого микроорганизма в пищевые продукты и/или корма для животных, для обеспечения молочнокислыми бактериями в медицинских 30 целях. Сочетание смешивания культивируемой бактерии с одним или несколькими носителями и обработки микроорганизмов в композиции значительно повышает исходную выживаемость и срок хранения композиции. (патент РФ № 2370525 C2 от 2005.03.30)

Недостатком способа является необходимость обработки импульсными 35 электромагнитными полями. Кроме того, полученные продукты не предназначены для лечения ран у животных.

За прототип выбрано техническое решение по патенту US5695541 (A) (опубликован 1997-12-09), в котором раскрывается способ иммобилизации высушенных микроорганизмов, а именно видов микроорганизмов, выбранных из *B. japonicum*, *R. meliloti*, *R. leguminosarum biovar trifolii*, *Viciae* и *phaseoli*, видов *Bradyrhizobium* для арахиса 40 и *B. lupini*, путем смешивания микроорганизмов с носителем, а именно смеси каолинита и монтмориллонита, имеющей рН диапазон примерно от 5 до 8. Массовое отношение культуры к носителю на стадии смешивания находится в диапазоне от 1:2 до 1:4. Затем инкубируют смесь культура-носитель в течение, по меньшей мере, одного дня при температуре в диапазоне от 20 до 30°C и уровня влажности в диапазоне примерно от 25 до 33 мас. % по сырому весу смеси, так чтобы количество микроорганизмов в 45 указанной смеси увеличилось; затем сушат полученную смесь в течение по меньшей мере около одного дня при температуре в диапазоне от 20 до 30°C до влажности не менее чем около 15 вес. % на влажной основе. Дополнительно выдерживают смесь в течение примерно 3-14 дней при относительной влажности в диапазоне от 35 до 60%,

так что уровень влажности смеси постепенно снижается до примерно 1-5 мас. % по влажной основе. Измельчают с формированием частиц указанного состава, имеющих размер в диапазоне от примерно 0,1 до 150 микрон. Данное изобретение относится к усовершенствованному процессу медленной сушки бактериальных сельскохозяйственных инокулянтов и других композиций, которые способствуют повышенной жизнеспособности бактерий для борьбы с насекомыми, грибами и т.п., или микроорганизмов, которые обладают эффектами стимуляции роста.

Недостатком является то, что сорбционная активность глины использована не в полной мере, а также то, что полученный продукт не может быть использован для лечения ран животных.

Задачей группы изобретений является разработка способа иммобилизации микроорганизмов *Lysobacter* sp. на монтмориллонитовые глины с целью получения средства для лечения ран животных.

Технический результат изобретения – продление срока хранения бактериальных клеток *Lysobacter* sp. на носителе из монтмориллонитовой глины, с возможностью обеспечения восстановления их активности при нанесении на раневую поверхность.

Бактериальные клетки *Lysobacter* sp. выбраны, так как из уровня техники известно, что они продуцируют антибактериальные и антимикробные агенты (Боннер, Д. П., Дж. О'Салливан, С. К. Танака, Дж. М. Кларк и Р. Р. Уитни. 1988. Лизобактин-новое антибактериальное средство, продуцируемое *Lysobacter* sp. II. биологические свойства. Дзюдо (Токио) 41:1745-51) (Hashizume, H., S. Hirokawa, R. Sawa, Y. Muraoka, D. Ikeda, H. Naganawa и M. Igarashi. 2004. Трипропептины, новые антимикробные агенты, производимые *Lysobacter* sp. J Antibiot (Токио) 57:52-8).

Поставленная задача решается путем предложенного ниже способа иммобилизации микроорганизмов *Lysobacter* sp. на монтмориллонитовые глины (далее МСГ), в состав которых могут входить иллит, кварц, мусковит:

- при этом МСГ предварительно обогащают и затем активируют соляной кислотой 10%, после чего промывают очищенной дистиллированной водой до нейтральной среды, сушат при температуре не более 105°C и измельчают на шаровой мельнице до размеров частиц не более 10 мкм;

- биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. заливают 0,05 М трис – гидрохлорида буферным раствором с рН 7,5 и перемешивают, при перемешивании смесь постепенно нагревают до 45°C в течение 5 минут. Далее охлаждают до комнатной температуры, затем центрифугируют и супернатант сливают. Такая обработка вызывает остановку клеточного цикла, нарушение внутриклеточных транспортных процессов, а главное способствует накоплению трегалозы, что способствует образованию L-формы микроорганизма, обладающей бактериолитической активностью в отношении живых условно-патогенных и патогенных бактерий, включая и множественно устойчивые штаммы (интернет-источник http://mbio.bas-net.by/wp-content/uploads/2015/09/07_Kudryakova_2015.pdf);

- затем к остатку обработанной биомассы в виде L-формы *Lysobacter* sp. при постоянном механическом перемешивании постепенно добавляют обогащенную и активированную МСГ в соотношении носитель: биомасса равном 1:(2-4) при температуре 25°C;

- смесь тщательно перемешивают в течение не менее 40 минут;

- затем подвергают лиофильной сушке при температуре минус 40-45°C в течение 24 часов до уровня 3-7% влажности композиции.

Изобретение может быть проиллюстрировано следующими примерами его

конкретного осуществления.

Пример 1.

Биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. 20 гр заливают 40 мл 0,05 М трис – гидрохлорида буферным раствором pH 7.5, перемешивают, центрифугируют и супернатант сливают. Затем подвергают лиофильной сушке в течение 24 часов до уровня 3-7% влажности композиции.

Пример 2.

Биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. 20 гр заливают 40 мл 0,05 М трис – гидрохлорида буферным раствором pH 7.5, перемешивают и постепенно нагревают до 45°C в течение 5 минут. Далее охлаждают до комнатной температуры, затем центрифугируют и супернатант сливают. Такая обработка вызывает остановку клеточного цикла, нарушение внутриклеточных транспортных процессов, а главное способствует накоплению трегалозы, что способствует образованию L-формы микроорганизма. Затем подвергают лиофильной сушке в течение 24 часов до уровня 3-7% влажности композиции.

Пример 3.

Иммобилизация микроорганизмов на монтмориллонитовые глины в соотношении носитель: биомасса равном 1:2.

Проводят подготовку монтмориллонит содержащей глины, для чего осуществляют седиментационное обогащение монтмориллонит содержащей глины в воде путем выдержки суспензии в течение 24 часов, взмучивают в течение одной минуты и отстаивают суспензию в течение 20 минут, затем отбирают надосадочную суспензию с размером глиняных частиц менее 10 мкм из верхнего 10-сантиметрового слоя, отстаивают еще 10 минут и после седиментации суспензии декантируют осветленную воду, затем сушат осадок обогащенной МСГ в сушильном шкафу при 70-105°C. При наличии соответствующего оборудования процесс сушки можно проводить при температуре до 900°C, что сокращает длительность процесса, но повышает его энергоемкость. После обогащенную МСГ измельчают до однородной консистенции. Затем МСГ активируют соляной кислотой 10%, после чего промывают очищенной дистиллированной водой до нейтральной среды, сушат при температуре не более 105°C и измельчают на шаровой мельнице до размеров частиц не более 10 мкм.

Биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. в количестве 20 гр заливают 40 мл 0,05 М трис – гидрохлорида буферным раствором pH 7.5, перемешивают и постепенно нагревают до 45°C течение 5 минут. Далее охлаждают до комнатной температуры, затем центрифугируют и супернатант сливают. Такая обработка вызывает остановку клеточного цикла, нарушение внутриклеточных транспортных процессов, а главное способствует накоплению трегалозы, что способствует образованию L-формы микроорганизма. Затем к остатку обработанной биомассы при температуре 25°C постепенно добавляют 10 гр МСГ при постоянном механическом перемешивании. Смесь тщательно перемешивают в течение не менее 40 минут. Затем подвергают лиофильной сушке в течение 24 часов до уровня 3% влажности композиции.

Пример 4.

Иммобилизация микроорганизмов на монтмориллонитовые глины в соотношении носитель: биомасса равном 1:3.

Монтмориллонитовую глину готовят как в примере 3.

Биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. в количестве 30 гр заливают 60 мл 0,05 М трис – гидрохлорида буферным раствором pH

7.5, перемешивают и постепенно нагревают до 45°C в течение 5 минут. Далее охлаждают до комнатной температуры, затем центрифугируют и супернатант сливают. Такая обработка вызывает остановку клеточного цикла, нарушение внутриклеточных транспортных процессов, а главное способствует накоплению трегалозы, что способствует образованию L-формы микроорганизма. Затем к остатку обработанной биомассы при температуре 25°C постепенно добавляют 10 гр. МСГ при постоянном механическом перемешивании. Смесь тщательно перемешивают в течение не менее 40 минут. Затем подвергают лиофильной сушке в течение 24 часов до уровня 5 % влажности композиции.

Пример 5.

Иммобилизация микроорганизмов на монтмориллонитовые глины в соотношении носитель: биомасса равном 1:4.

Монтмориллонитовую глину готовят как в примере 3.

Биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. в количестве 40 гр заливают 80 мл 0,05 М трис – гидрохлорида буферным раствором рН 7.5, перемешивают и постепенно нагревают до 45°C течение 5 минут. Далее охлаждают до комнатной температуры, затем центрифугируют и супернатант сливают. Такая обработка вызывает остановку клеточного цикла, нарушение внутриклеточных транспортных процессов, а главное способствует накоплению трегалозы, что способствует образованию L-формы микроорганизма. Затем к остатку обработанной биомассы при температуре 25°C постепенно добавляют 10 гр МСГ при постоянном механическом перемешивании. Смесь тщательно перемешивают в течение не менее 40 минут. Затем подвергают лиофильной сушке в течение 24 часов до уровня 7% влажности композиции.

Исходную выживаемость после иммобилизации микроорганизмов *Lysobacter* sp. на монтмориллонитовые глины по примерам 1-5, определяли методом Pour Plate, при котором образец суспендируют в чашке Петри с использованием расплавленного агара, охлажденного примерно до 40-45°C (чуть выше точки затвердевания, чтобы минимизировать гибель клеток, вызванную нагреванием). После застывания питательного агара планшет инкубируют.

Результаты (на основе колониеобразующих единиц CFU) представлены в приведенной ниже таблице.

Режим обработки бактерий	КОЕ* (г/л) после хранения		
	На 2 сутки	На 71 сутки	На 92 сутки
Пример 1	$2,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$
Пример 2	$1,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
Пример 3	$3,6 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
Пример 4	$3,5 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$
Пример 5	$3,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$

* $p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента

Из таблицы следует, что температурный шок перед иммобилизацией микроорганизма путем постепенного нагревания биомассы до 45°C с последующим сочетанием с предложенным носителем повышает исходную выживаемость в течение длительного срока хранения.

Таким образом, предложенный способ иммобилизации микроорганизмов *Lysobacter*

сп. на обогащенные и активированные монтмориллонитовые глины приводит к повышенной жизнеспособности микроорганизма в течение длительного срока хранения. Ограничение жизнедеятельности микроорганизмов перед нанесением на монтмориллонитовые глины позволяет сохранить качественный и количественный состав исходного биоматериала и обеспечить восстановление их активности при нанесении на раневую поверхность.

(57) Формула изобретения

1. Способ иммобилизации микроорганизмов на монтмориллонитовые глины, включающий смешивание предварительно обогащенной и активированной 10%-ной соляной кислотой монтмориллонитовой глины с биологическим материалом в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp., причем монтмориллонитовую глину после активации промывают очищенной дистиллированной водой до нейтральной среды, сушат при температуре не более 105°C и измельчают на шаровой мельнице до размеров частиц не более 10 мкм; а биологический материал в виде биомассы микроорганизмов *Lysobacter* sp. предварительно заливают 0,05 М трис-гидрохлорида буферным раствором с рН 7,5 и перемешивают, причем при перемешивании смесь постепенно нагревают до 45°C в течение 5 минут, далее охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют, после чего сливают супернатант и к остатку обработанной биомассы в виде L-формы *Lysobacter* sp. при постоянном механическом перемешивании постепенно добавляют измельченную глину в соотношении носитель : биомасса, равном 1:(2-4), при температуре 25°C; смесь тщательно перемешивают в течение не менее 40 минут и затем подвергают лиофильной сушке при температуре минус 40-45°C в течение 24 часов до уровня 3-7% влажности композиции.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что обогащенную монтмориллонитсодержащую глину получают используя седиментационный способ путем выдержки суспензии монтмориллонитовой глины в воде в течение 24 часов, затем суспензию взмучивают в течение одной минуты и отстаивают в течение 20 минут, затем отбирают надосадочную суспензию с размером глиняных частиц менее 10 мкм из верхнего 10-сантиметрового слоя, отстаивают еще 10 минут и после седиментации суспензии декантируют осветленную воду, затем сушат осадок обогащенной глины и измельчают до однородной консистенции.

35

40

45