



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2025.01); A01N 63/22 (2025.01)

(21)(22) Заявка: 2024131379, 18.10.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.10.2024

Дата регистрации:
14.04.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.10.2024

(45) Опубликовано: 14.04.2025 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Шевцова Ирина Владимировна

(72) Автор(ы):

Ляховченко Никита Сергеевич (RU),
Кузубова Елена Валерьевна (RU),
Селезнев Александр Олегович (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: RU 2689530 C2, 28.05.2019. RU
2784914 C2, 01.12.2022. RU 2354690 C2,
10.05.2009. Пусенкова Л.И. и др.
Эффективность инокуляции семян яровой
пшеницы эндофитными бактериями *Bacillus
subtilis* 26Д; Проблемы агрохимии и экологии,
2020, N 3, с.56-64.

(54) Способ получения композиции на основе *Bacillus subtilis* В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ получения композиции на основе *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, включающий культивирование суточной культуры клеток штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D в питательной среде следующего состава: пептон - 30 г и вода - 1000 мл, при 30°C, pH 7, и перемешивание 150 об/мин до концентрации не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, затем вносят стерильный порошок $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ из расчета 40 г на 1 л жидкой культуры с концентрацией *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D не

менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г, продолжая перемешивание 10 мин при 30°C, затем полученную смесь *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ замораживают при минус 40°C в течение 12 ч, после чего лиофильно высушивают в вакууме в течение 17 ч до порошкообразного состояния, причем $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ стерилизуют путем автоклавирования при 115°C в течение 30 мин. Изобретение обеспечивает расширение арсенала средств для повышения всхожести семян в растениеводстве. 1 ил., 2 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/20 (2025.01); A01N 63/22 (2025.01)(21)(22) Application: **2024131379, 18.10.2024**

(24) Effective date for property rights:
18.10.2024

Registration date:
14.04.2025

Priority:

(22) Date of filing: **18.10.2024**(45) Date of publication: **14.04.2025** Bull. № 11

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Shevtsova Irina Vladimirovna**

(72) Inventor(s):

**Liakhovchenko Nikita Sergeevich (RU),
Kuzubova Elena Valerevna (RU),
Seleznev Aleksandr Olegovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF PRODUCING COMPOSITION BASED ON BACILLUS SUBTILIS B-3728D AND $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed is a method of producing a composition based on *Bacillus subtilis* VKM B-3728D and $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, involving cultivation of a daily cell culture of the *Bacillus subtilis* VKM B-3728D strain in a nutrient medium of the following composition: peptone – 30 g and water – 1000 ml, at 30 °C, pH 7, and mixing 150 rpm to concentration of not less than $1 \cdot 10^9$ CFU/ml, then sterile powder is added $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ at rate of 40 g per 1 l of liquid culture with concentration of *Bacillus subtilis* VKM B-3728D

not less than $1 \cdot 10^9$ CFU/g, while continuing stirring for 10 minutes at 30 °C, then obtained mixture of *Bacillus subtilis* VKM B-3728D and $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ frozen at minus 40 °C for 12 hours, then freeze-drying in vacuum for 17 hours to powdery state, wherein $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ is sterilized by autoclaving at 115 °C for 30 minutes.

EFFECT: invention widens the range of agents for increasing seed germination in plant growing.

1 cl, 1 dwg, 2 tbl, 4 ex

Изобретение относится к области биотехнологии, микробиологии и может быть использовано в сельском хозяйстве, а именно для повышения всхожести семян в растениеводстве.

Все организмы в природе находятся в условиях постоянного взаимодействия между собой. Семена, попадая в почву, подвергаются воздействию микроорганизмов, многие из которых способны выступать в качестве защитника от возбудителей болезней растений, а также стимулировать ростовые свойства растений. Однако не малую роль играют и внешние факторы химической природы, в частности наличие или отсутствие важных микро- и макроэлементов.

В патенте RU 2689530 C2 описан штамм бактерии *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis*, проявляющий противомикробную и/или противогрибковую активность и активность, стимулирующую рост растений. Указанный штамм имеет депонирован в коллекции типов микробных культур (МТСС) под номером 5674 в IMTECH, Chandigarh, India. В патенте также предложен экстракт, обладающий противомикробной и/или противогрибковой активностью и полученный с применением указанного штамма, а также композиция, включающая штамм бактерии *Bacillus subtilis* ssp. *shriramensis* и один или несколько агентов, выбранных из группы, состоящей из противомикробного агента, противогрибкового агента, стимулирующего рост растения агента и их комбинаций, где композиция обладает противомикробной и/или противогрибковой активностью и активностью, стимулирующей рост растений, при концентрации штамма от 5×10^5 до 5×10^7 КОЕ/мл и при концентрации от 4 до 20 мкг/мкл экстракта. Где в качестве носителя использованы КМЦ, карбендазим либо почва, содержащая смесь перлита сфагнового мха и вермикулита. Группа изобретений может быть использована для обработки против различных патогенных грибов и/или бактерий и стимуляции роста растений. Преимущества предложенного изобретения прослеживается в широком ассортименте возможных эффектов, например противогрибковых, противобактериальных, амилолитических и стимулирующих рост растений.

Однако есть несколько ограничений: новизна штамма и наличие его только в зарубежной коллекции ограничивает его доступность для промышленного применения в России; предложенные композиции содержат более трех компонентов, что увеличивает количество стадий производства.

Задача изобретения заключается в разработке способа получения композиции на основе отечественного штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $(\text{CaH}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Технический результат - способ позволяет получить композицию, в которой использование однозамещённого фосфорнокислого кальция $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в качестве компонента композиции позволяет придать ей свойства фосфорного удобрения, т.к. в процессе своей жизнедеятельности, штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D способен растворять нерастворимый $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, что обеспечивает достижение всхожести семян при сниженном содержании штамма в композиции. Кроме того, неожиданно выяснилось, что $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, обладающий способностью выступать в качестве носителя микробных клеток и их метаболитов, защищает *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D от потери жизнеспособности при лиофилизации и увеличивает срок хранения штамма, т.к. численность колониеобразующих единиц штамма в композиции через 12 месяцев выдержки при стандартных условиях выше, чем в чистой культуре.

Таким образом, композиция, полученная по предложенному способу, может быть использована для использования в растениеводстве.

Бактерии *Bacillus subtilis* широко распространены в качестве компонентов

биопрепаратов - средств защиты растений, пробиотиков, или кормовых добавок, и в качестве продуцентов ферментов. Кроме того, они являются типичными почвенными представителями микрофлоры.

Штамм *Bacillus subtilis* КЕ1, предлагаемый для использования в заявленной композиции, зарегистрирован во всероссийской коллекции микроорганизмов 07.06.2023 г. под номером ВКМ В-3728D, выделен из почвы Белгородской области методом серийных разведений на питательный агар следующего состава: пептон - 30 г; агар - 1,5 г, вода водопроводная - 1000 мл.

Культуральные и морфологические свойства штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D

Палочковидные грамположительные подвижные спорообразующие бактерии

Физиолого-биохимические свойства штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D

Штамм является факультативным аэробом и обладает протеолитической, целлюлолитической, липолитической, амилалитической, каталазной активностью. Способен выделять аммиак. Тест на наличие нитратредуктазы был положительным, что свидетельствует о способности культуры к азотфиксации.

Штамм использует D-глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, маннит, сорбит, тирозин, фенилаланин, дегидроксифенилаланин, изолейцин и лизин. Из углеводов сахарозу, лактозу, D-фруктозу и D-глюкозу, а из солей органических кислот - цитрат и ацетат натрия.

Способ получения композиции на основе *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ включает в себя культивирование суточной культуры клеток штамма

Bacillus subtilis ВКМ В-3728D до концентрации не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, при 30°C, pH 7 и перемешивании 150 об/мин в питательной среде следующего состава: пептон - 30 г и вода - 1000 мл, затем вносят стерильный порошок $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ из расчета 40 г на 1

л жидкой культуры с концентрацией *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г, продолжая перемешивание при 30°C в течение 10 минут, полученную смесь *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ замораживают при минус 40°C в течение 12

часов, после чего лиофильно высушивают в вакууме течение 17 часов до порошкообразного состояния, причем $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ стерилизуют путем автоклавирования при температуре 115°C в течение 30 минут.

Изобретение характеризует следующее графическое изображение.

Фиг. 1. Изменение оптической плотности, где линия 1 - оптическая плотность культуральной жидкости в ходе культивирования, а линия 2 - оптическая плотность раствора, содержащего свободный фосфат.

Способ получения композиции на основе *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Получают суточную культуру клеток штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и осуществляют культивирование суточной культуры, для чего суточную культуру суспендируют и вносят в питательную среду следующего состава: пептон - 30 г и вода - 1000 мл. После чего культивируют до концентрации клеток штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, при следующих условиях: 30°C, pH среды 7, перемешивание при 150 об/мин.

Стерилизуют $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ путем автоклавирования при температуре 115°C в течение 30 минут.

По окончании культивирования вносят стерильный порошок $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ из расчета 40 г на 1 л. жидкой культуры с концентрацией *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D

не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г, продолжая перемешивание при 30°C в течение 10 минут.

Полученную смесь *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ разливают по ёмкостям и замораживают при минус 40°C в течение 12 часов, после чего лиофильно высушивают в вакууме течение 17 часов до порошкообразного состояния.

В результате получают композицию, содержащую *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D в количестве не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Определение всхожести семян среднерослого сорта пшеницы озимой

Всхожесть семян среднерослого сорта пшеницы озимой определяют следующим образом:

В каждой чашке размещают по 50 семян, предварительно обработанных в течение 60 минут:

- дистиллированной водой - контрольная серия 1;

- раствором 4% $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - контрольная серия 2;

- растворами, содержащими $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, в разбавлениях $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-10}$ и $1 \cdot 10^{-11}$ - контрольная серия 3;

- растворами экспериментальной композиции, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, в разбавлениях $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-10}$ и $1 \cdot 10^{-11}$ - опытная серия.

Повторность опыта - 3-кратная.

Затем семена проращивают в стерильных чашках Петри на фильтровальной бумаге в термостате при температуре 20°C , в соответствии с требованиями ГОСТ 12038-84. Учет прорастания семян осуществляют на 7-е сутки.

К числу всхожих семян относят те, которые дают росток и нормально развитый корешок. При этом, всхожесть рассчитывают с использованием формулы:

$$\text{Всхожесть} = \left(\frac{\text{количество проросших семян}}{\text{общее число семян}} \right) * 100\% \quad (1)$$

Главный корешок по длине должен быть не меньше семени, а росток - не меньше половины семени.

В полученных разбавлениях оценивают численность *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, с учетом колониеобразующих единиц в мл суспензии, или КОЕ/мл. Для этого исследуемую композицию и тест-культуру *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D высевает на чашку Петри с агаризированной питательной средой, содержащей 3% пептона, методом серийных разведений сплошным посевом, из серийных разведений отбирают аликвоту в количестве 0,1 мл на чашку.

Посевы инкубируют в течение 24 часов. Через сутки выросшие колонии подсчитывают и общее количество колониеобразующих единиц рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{a \cdot 10^n}{V}, \quad (2)$$

где: N - численность колониеобразующих единиц, а - среднее арифметическое

количества колоний в чашках; 10^n - разведение; V - объем аликвоты, мл.

Пример 1

1. Подготавливают суточную культуру грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D на плотной питательной среде, содержащей, из расчета г/л, пептон - 30,0

г, агар-агар микробиологический - 20,0 г, воду - 1 л.

2. Подготовленную культуру по п.1 отбирают микробиологической петлей и смешивают со стерильной водой в количестве 4 мл с получением оптической плотности 0,9 ОЕ при длине волны 600 нм. После чего, полученную смесь вносят в 100 мл жидкой питательной среды, содержащей 3 г пептона, и культивируют в течение 3 суток при температуре 30°C и перемешивании 150 об/мин.

3. После окончания культивирования, согласно п. 2, подготавливают однозамещенный фосфорнокислый кальций $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ путем стерилизации автоклавированием при температуре 115°C в течение 30 минут.

4. Получают заявленную композицию путем добавления к 100 мл культуральной жидкости *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, концентрация клеток которого не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, 40 г остывшего стерильного $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

5. Смесь перемешивают при 150 об/мин в течение 10 минут при 30°C.

6. Полученную смесь разливают в емкости для лиофилизации по 20 мл в каждую емкость.

7. Замораживают полученную смесь при минус 40°C в течение 12 часов.

8. Лиофилизируют смесь в течение 17 часов в вакууме.

В результате получают сыпучий порошок композиции, содержащей $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Все процедуры по п.1, 2, 6, 7 и 8 повторяют для чистой культуры штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, без внесения $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. В результате получают сухой порошок чистой культуры *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, с концентрацией клеток не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г. Этот вариант используют для сравнения всхожести семян пшеницы озимой среднерослой после обработки.

Пример 2

1. Готовят контрольные образцы 1 следующим образом: 50 семян озимой пшеницы среднерослой выдерживают в стерильной дистиллированной воде в течение 60 мин, вынимают и размещают на фильтровальной бумаге, в стерильной чашке Петри.

2. Готовят контрольные образцы 2 следующим образом: 50 семян озимой пшеницы среднерослой выдерживают в 4% растворе $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ течение 60 мин, вынимают и размещают на фильтровальной бумаге, в стерильной чашке Петри.

3. Готовят контрольные образцы 3 с чистой культурой *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D следующим образом: по 50 семян озимой пшеницы среднерослой выдерживают в суспензии чистой культуры *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, в следующих разбавлениях: $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-10}$ и $1 \cdot 10^{-11}$.

3. Готовят опытные образцы с композицией *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, следующим образом: по 50 семян озимой пшеницы среднерослой выдерживают в суспензии композиции в следующих разбавлениях: $11 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-10}$ и $1 \cdot 10^{-11}$.

4. Все образцы, подготовленные в трехкратной повторности, выдерживают при 20°C в течение 7 суток. По окончании выдержки во всех образцах считают количество всхожих семян, к числу которых относят те, которые дают росток и нормально развитый корешок, т.е. главный корешок по длине должен быть не меньше семени, а росток - не меньше половины семени.

5. С использованием формулы 1 рассчитывают всхожесть образцов в каждой серии,

результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Всхожесть семян озимой пшеницы среднерослой

	Контрольная серия	Всхожесть, %	
		Композиция заявленная	<i>Bacillus subtilis</i> ВКМ В-3728D
5	Контрольная серия 1 без обработки	72	
	Контрольная серия 2 обработка $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	76	
	Степень разведения контрольной серии 3 и опытной серии		
	$1 \cdot 10^{-2}$	70	67
10	$1 \cdot 10^{-3}$	73	75
	$1 \cdot 10^{-4}$	76	76
	$1 \cdot 10^{-5}$	81	80
	$1 \cdot 10^{-6}$	95	94
	$1 \cdot 10^{-7}$	91	93
15	$1 \cdot 10^{-8}$	84	87
	$1 \cdot 10^{-9}$	77	74
	$1 \cdot 10^{-10}$	75	75
	$1 \cdot 10^{-11}$	72	73

Из таблицы 1 видно, что оптимальным вариантом разведения полученной композиции является $1 \cdot 10^{-6}$, так как всхожесть превышает контрольный вариант, в котором не было обработки, на 23%, а вариант с обработкой только $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ без бактерии, на 19%, тогда как для варианта с чистой культурой и контролем, различие составило 22%.

Пример 3. Оценка численности *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, с учетом колониеобразующих единиц в мл суспензии (КОЕ/мл)

1. По 0,1 г полученных по примеру 1 порошков композиции *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и чистого штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D смешивают с 10 мл стерильного раствора 0,9% NaCl. Перемешивают.

2. Соблюдая асептические условия, 1 мл полученных взвесей по п. 1 переносят в пробирку с 9 мл 0,9% NaCl. Перемешивают.

3. Отбирают 1 мл с пробирки, полученной по пункту 2, и переносят в новую пробирку с 9 мл 0,9% NaCl. Перемешивают и повторяют процедуру до 10 пробирки.

4. Из каждой пробирки отбирают 100 мкл и пассируют на плотной питательной среде с использованием шпателя Дригальского. Процедуру проводят в трех повторах.

5. Посевы инкубируют при 30°C в течение 48 часов.

6. Подсчитывают выросшие колонии и затем рассчитывают численность колониеобразующих единиц по формуле 1.

7. Полученные порошки заявленной композиции и чистого штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D выдерживают при 25°C в термостате в течение 12 месяцев и повторяют процедуры по пунктам 1-5, после чего подсчитывают выросшие колонии и рассчитывают численность колониеобразующих единиц по формуле 1.

8. Сравнение полученных результатов по определению численности колониеобразующих единиц *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D с учетом колониеобразующих единиц в мл суспензии по п. 6 и 7 приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Численность *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D (КОЕ/мл)

Варианты	Масса навески препарата в 10 мл 0,9%-го раствора NaCl, г	Численность колониеобразующих единиц, КОЕ/мл	
		1 сутки	12 месяцев

Чистый штамм <i>Bacillus subtilis</i> ВКМ В-3728D	0,1	$2,3 \cdot 10^{10}$	$5,0 \cdot 10^7$
Композиция на основе <i>Bacillus subtilis</i> ВКМ В-3728D с $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1	$5,0 \cdot 10^9$	$7,4 \cdot 10^8$

Таким образом, численность колониеобразующих единиц композиции *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D с $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ через 12 месяцев выдержки при стандартных условиях выше, чем в чистой культуре.

Пример 4. Оценка влияния *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D на растворимость $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, что обеспечивает достижение всхожести семян при сниженном содержании штамма в композиции

1. Полученный порошок композиции *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D с $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ по примеру 1 в количестве 0,1 г вносят в 200 мл жидкой питательной среды, содержащей (масс%) пептона - 2,0, сахарозы - 4,0, а остальное - вода.

2. Посевы инкубируют при 30°C с перемешиванием при 150 об/мин. Каждые 4 часа оценивают оптическую плотность в 1 мл культуры, с использованием спектрофотометра при длине волны 600 нм.

3. Каждые 4 часа оценивают содержание свободных фосфатов в культуральной жидкости. Для этого, отбирают по 1 мл культуры в 4 повторах и центрифугируют при 13000 об/мин в течение 10 минут.

4. Свободный фосфат в надосадочной жидкости, полученной по пункту 3, определяют с использованием метода Кирсанова. Для этого 6 г молибденовокислого аммония растворяют в 200 мл дистиллированной воды при постоянном нагревании. После того, как раствор остынет, вносят 1 г аскорбиновой кислоты и дают настояться в течение 30 минут. Полученный раствор в объеме 1 мл приливают к такому же количеству исследуемого образца, выдерживают в течение 15 минут и измеряют оптическую плотность при длине волны $\lambda = 710$ нм. В качестве холостой пробы используют смесь молибденовокислого аммония с аскорбиновой кислотой без фосфатов. О высвобождении свободного фосфата судят по изменению оптической плотности.

5. Наблюдают изменения оптической плотности культуры и растворов свободного фосфата.

6. На фиг. 1 видно, что повышение содержания свободного фосфата, начиная с 8 часа культивирования, что подтверждает то, что по мере роста культуры *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, нерастворимый $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ растворяется, а фосфат высвобождается.

Таким образом, заявленный способ получения позволяет получить композицию на основе штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, обладающую свойствами фосфорного удобрения, что обеспечивает достижение всхожести семян при сниженном содержании штамма в композиции. А также увеличение срока хранения клеток штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D, т.к. численность колониеобразующих единиц штамма в композиции через 12 месяцев выдержки при стандартных условиях выше, чем в чистой культуре.

Таким образом, поставленная задача решена, и технический результат достигнут - заявленная композиция может быть использована в растениеводстве.

(57) Формула изобретения

Способ получения композиции на основе *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ для повышения всхожести семян в растениеводстве, включающий культивирование суточной культуры клеток штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D в

питательной среде следующего состава: пептон - 30 г и вода - 1000 мл, при 30°C, pH 7, и перемешивание 150 об/мин до концентрации не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, затем вносят стерильный порошок $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ из расчета 40 г на 1 л жидкой культуры с

- 5 концентрацией *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г, продолжая перемешивание при 30°C в течение 10 мин, затем полученную смесь *Bacillus subtilis* ВКМ В-3728D и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ замораживают при минус 40°C в течение 12 ч, после чего лиофильно высушивают в вакууме в течение 17 ч до порошкообразного состояния, причем $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ стерилизуют путем автоклавирования при температуре 115°C
- 10 в течение 30 мин.

15

20

25

30

35

40

45



Фиг.1