

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43)Дата публикации заявки 2019.01.31
- Дата подачи заявки (22)2018.05.23

(51) Int. Cl. *C02F 3/34* (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

- (54) КОНСОРЦИУМ МИКРООРГАНИЗМОВ 7ВLВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДОЕМОВ И ПРУДОВ-НАКОПИТЕЛЕЙ ОТ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ
- (31)2017/0473.1
- (32)2017.05.30
- (33) KZ
- (96)KZ2018/030 (KZ) 2018.05.23
- (71)Заявитель: **ТОВАРИЩЕСТВО** С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "БИОМИКС" (KZ)
- **(72)** Изобретатель: Закарья Кунсулу, Сармурзина Зинегуль Сериковна (КZ)
- (74) Представитель: Асылханов А.С. (KZ)

(57) Изобретение относится к области микробиологии, биотехнологии и экологии, может быть использовано для очистки водоемов и прудов-накопителей от органических загрязнений. Технический результат, который может быть достигнут при осуществлении изобретения - это снижение органических веществ в водоемах и прудах-накопителях (по химическому потреблению кислорода (ХПК)), высокая антагонистическая активность к условно-патогенной микрофлоре, широкий спектр ферментативной активности. Данные штаммы не токсичны, не патогенны, безвредны для людей, животных и растений, некоррозивны, полностью биоразлагаемы, безопасны для окружающей среды. Технический результат достигается за счет того, что в отличие от прототипов предлагаемый консорциум для деградации органических загрязнений благодаря своему определенному составу эффективных природных микроорганизмов направленного многофункционального действия обеспечивает усиленную ферментацию органических загрязнений, в том числе трудно разлагающихся, обеззараживает воду за счет заселения полезными микробами - антагонистами патогенной и условно-патогенной микрофлоры. А также технический результат достигается за счет совместного культивирования заявляемых штаммов. Предлагаемое изобретение на основе консорциума бактериальных штаммов 7BLB (Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LBB-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742) позволяет снизить количество органических веществ в загрязненных водах (по химическому потреблению кислорода (ХПК)). Данный консорциум бактериальных штаммов рекомендуется в качестве основы для биопрепарата для очистки водоемов и прудов-накопителей от органических загрязнений.

## Консорциум микроорганизмов 7BLB, используемый для очистки водоемов и прудов-накопителей от органических загрязнений

Изобретение относится к области микробиологии, биотехнологии и экологии, может быть использовано для очистки водоемов и прудов-накопителей от органических загрязнений. В состав консорциума входят 7 штаммов микроорганизмов различных таксономических групп, которые депонированы в Республиканской коллекции микроорганизмов:

- Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17
- Lactobacillus bulgaricus BM-3/17
- Lactobacillus casei BM-4/17
- Lactobacillus acidophilus BM-5/17
- Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607
- Bacillus subtilis BM-2/17
- Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742.

Природный водоем представляет собой биологически сбалансированную экологическую систему, настроенную на самоочищение и самовосстановление. Это естественное состояние биологического баланса водоема (гидрохимический режим) может быть нарушено в результате как естественного старения водоема, так и антропогенного и техногенного воздействия на водоем. Интенсивное загрязнение водоема органическими веществами и питательными (биогенными) элементами может происходить в результате прямого внесения ядохимикатов при обработке водоемов для борьбы с вредителями; поступления в водоемы воды, стекающей с поверхности обработанных сельскохозяйственных угодий; при сбросе в водоемы отходов предприятий-производителей. Сбросные воды увеличивают содержание в принимающих водоемах и водотоках органических и взвешенных веществ, неорганических форм азота и фосфора, растворенных солей. Избыток в водоеме органических веществ приводит сначала к нарушению эффективности биологического равновесия И снижению биологического самоочищения водоема, а затем к изменению трофического статуса экосистемы. Эвтрофирование водоема может стать причиной полной водохозяйственного и биогеоценотического значения. Вода может также являться фактором передачи возбудителей многих бактериальных и вирусных болезней. При эвтрофировании водоемов значение данного фактора возрастает, поскольку при этом меняются микробные ценозы и генетические свойства возбудителей инфекционных болезней людей. Среди различных заболеваний, передающихся водным путем, особое значение имеет группа кишечных инфекций бактериальной и вирусной этиологии. Поэтому для рыбохозяйственной деятельности проблема улучшения качества воды в рыбоводных прудах имеет первостепенное значение. В последние годы все большую активность приобретает биологическая очистка. В основе биологического метода очистки и обеззараживания воды лежит явление

биоремедиации — преобразование сложных веществ с помощью биологической активности в более простые ( $H_20$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$ ,  $NH_3$ ,  $CH_4$ ), а также способность подавлять развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

По данным «Казгидромет» в Казахстане признано чистыми 14% водоемов. Около 80 водных объектов Казахстана (86%) загрязнены в разной степени всевозможными химическими реагентами, органическими веществами и фекалиями. Из них два водных источника инспекторами отмечены как «очень грязные».

Проблема чистой пресной воды является одной из важнейших проблем современности, напрямую связанной с качеством очистки сточных вод, так как сброс неочищенных или некачественно очищенных сточных вод в пресные водоемы представляет угрозу загрязнения грунтовых и подземных вод и мест водозабора питьевой воды. Биологическая очистка представляет собой универсальный метод, позволяющий изымать в большей или меньшей степени растворенные, коллоидные, взвешенные вещества, простые и сложные формы органических веществ, ионы металлов, биогенные вещества (соединения азота и фосфора) с помощью микроорганизмов. Поэтому поиск новых штаммов микроорганизмов, способных поглощать органические загрязнения является актуальной задачей.

Известен консорциум бактериальных культур на основе штаммов *Pseudomonas aeruginosa G23* B-RKM 0286 и *Pseudomonas aeruginosa Zb 32* B-RKM 0284, используемый в качестве основы биопрепарата для очистки сточных вод от органических загрязнений (жиров). Псевдомонады обладают высокой липолитической и протеолитической активностью /KZ 31828 B, 30.01.2017 г./.

Недостатком данного изобретения является то, что штаммы, входящие в состав данного консорциума обладают ограниченным спектром активности (липолитическая и протеолитическая активность) и применим лишь для очистки жиросодержащих сточных вод мясокомбинатов и молочных заводов.

Известен консорциум бактериальных штаммов микроорганизмов различных родов и видов для очистки сточных вод. Консорциум состоит из 4 культур – amylofaciens, erythropolis, Bacillus Lactobacillus В результате оптимизации условий культивирования с целью Ochrobacter sp. биомассы отработаны получения максимального выхода культивирования: инокуляция клеток в дозе от  $10^6$  до  $10^8$  кл/см<sup>3</sup>, температура культивирования от 20°C до 30°C, сроки культивирования 24-48 ч, значение рН /Молдагулова Н.Б., Хасенова Э.Ж., Алдынгурова Ф.Ж., среды от 5 до 7 Меркурьева С.Н., Салхожаева Г.М., Курманбаев биотехнологического способа очистки сточных вод в лабораторных условиях //Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. - №10-1, 2016. - С. 35-38/.

Недостатком данного консорциума является то, что неизвестно о проявлении штаммов широкого антибактериального спектра в отношении условно-патогенной микрофлоры. Поэтому использование консорциума бактериальных штаммов микроорганизмов различных таксономических групп как

основы препарата для биологической очистки сточных вод водоемов и прудовнакопителей может оказаться неэффективным и экономически невыгодным.

Известен консорциум бактерий в качестве основы биопрепарата, состоящий из Bacillus subtilis 22, Bacillus subtilis 50, Bacillus subtilis 54, Pseudomonas aurantiaca 9, Rhodococcus sp. 1НГ для обеззараживания и очистки воды в прудах и водоемах от органических и минеральных примесей. Консорциум отобран по результатам оценки эффективности антимикробного действия, способности утилизировать биогенные элементы И оказывать влияние фитопланктона /Сверчкова, Н. В., Романовская Т.В. и др. Консорциум бактерий основа препарата для обеззараживания и очистки воды в прудах и водоемах / Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты [Текст]: сборник научных трудов / Национальная академия наук Беларуси, ГНПО "Химический синтез и биотехнологии", Институт микробиологии, Белорусский фундаментальных исследований, республиканский фонд общественное объединение микробиологов. - Минск : Беларуская наука, 2015. -C .445-458/.

Недостатком данного консорциума является то, что его основу составляют преимущественно четыре штамма. Кроме того, данные штаммы по своему географо-климатическим особенностям не приспособлены к резко-континентальному климату нашего региона.

Задача настоящего изобретения заключается в получении нового консорциума из штаммов микроорганизмов, способных деградировать (расщеплять) органические загрязнения.

Технический результат, который может быть достигнут при осуществлении изобретения — это снижение органических веществ в водоемах и прудахнакопителях (по химическому потреблению кислорода (ХПК), высокая антагонистическая активность к условно-патогенной микрофлоре, широкий спектр ферментативной активности. Данные штаммы не токсичны, не патогенны, безвредны для людей, животных и растений, некоррозивны, полностью биоразлагаемы, безопасны для окружающей среды.

Технический результат достигается за счет того, что в отличие от прототипов, предлагаемый консорциум для деградации органических загрязнений, благодаря своему определенному составу эффективных природных микроорганизмов направленного, многофункционального действия обеспечивает усиленную ферментацию органических загрязнений, в том числе трудно разлагающихся, обеззараживает воду за счет заселения полезными микробами - антагонистами патогенной и условно-патогенной микрофлоры. А также, технический результат достигается за счет совместного культивирования заявляемых штаммов.

Создание консорциумов на основе нескольких штаммов дает ряд преимуществ по сравнению с монокультурами. Консорциум как симбиотическая ассоциация способствует сохранению стабильных биологических характеристик микроорганизмов, кроме того в технологическом аспекте консорциум всегда предпочтительней, ввиду большего количества трансформируемых веществ.

В составе предлагаемого консорциума входят эффективные микроорганизмы из штаммов, относящихся к нескольким родам и видам, депонированные в Республиканскую коллекцию микроорганизмов: *Lactococcus, Lactobacillus*, *Bacillus*.

Предлагаемый в качестве нового изобретения консорциум 7BLB, состоящий из Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742, рекомендуется в качестве основы для биопрепарата для очистки водоемов и прудов-накопителей от органических загрязнений.

Внешний вид: все штаммы микроорганизмов консорциума имеют паспорта о депонировании в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» с присвоенными номерами *B-RKM 0743*, *B-RKM 0745*, *B-RKM 0746*, *B-RKM 0747*, *B-RKM 0607*, *B-RKM 0744*, *B-RKM 0742*.

Настоящее изобретение представляет собой консорциум из семи активных штаммов, обладающих высокой антагонистической активностью к условнопатогенной микрофлоре, а также широким спектром ферментативной активности.

Данные штаммы не токсичны, не патогенны, безвредны для людей, животных и растений, некоррозивны, полностью биоразлагаемы, безопасны для окружающей среды.

Штамм *Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17* был выделен из самоквасной сметаны, по описанию представляет собой грамположительные диплококки, расположены цепочками из 3-х клеток, величина клеток 1,0-1,1 мкм. Аэротолерантный аэроб, оптимальная температура роста 37-40°C. Образует диацетил.

Штамм *Bacillus subtilis BM-2/17* был выделен из очистных сооружений г. Астаны и представляет собой грамположительные палочки с овальными концами, размеры 0,5-0,7 мкм. На мясопептонном агаре образует колонии округлой формы, выпуклые, блестящие с ровными краями, консистенция мягкая, пастообразная поверхность, гладкие, бежевого цвета прозрачные, без пигментов, размеры колоний 1-2 мм. При росте на жидкой среде образует пленку, пристеночное кольцо, помутнение среды и осадок. Аэроб, оптимальная температура роста 30°C, оптимальный рН 5,0.

Штамм Lactobacillus bulgaricus BM-3/17 был выделен из 3-х суточного кумыса (кисломолочный напиток из кобыльего молока) и по описанию представляет собой грамположительные короткие толстые палочки с закругленными концами, размеры 0,9×4,0-6,0 мкм. На плотной среде образует плоские колонии с лопастным краем, на жидкой среде - осадок и помутнение. Факультативный анаэроб, оптимальная температура роста 37-39°C. Характерный продукт брожения – молочная кислота.

Штамм Lactobacillus casei BM-4/17 выделен из 3-х суточного кумыса и по описанию представляет собой грамположительные короткие толстые палочки с закругленными концами, размеры  $3,0-3,3\times0,9$  мкм. На плотной среде образует выпуклые колонии с цельным краем, консистенция маслянистая, поверхность гладкая, блестящие, белого цвета, непрозрачные, размером до 1 мм. На бульоне

образует осадок и помутнение. Факультативный анаэроб, оптимальная температура роста 39°C, pH–5,5. Обладает антагонистической активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий: Sarcina, Bac. mycoides, St. aureus, E. coli, Proteus, Diplococcus, Salmonella.

Штамм Lactobacillus acidophilus BM-5/17 был выделен из шубата (кисломолочный напиток из верблюжьего молока) и по описанию представляет собой грамположительные длинные, тонкие палочки с закругленными концами, размеры  $7,0-10,0\times0,7$  мкм. На плотной среде образует мелкие колонии, плоские с лопастным краем. При росте на жидкой среде образует осадок, помутнение и подкисление среды. Факультативный анаэроб, оптимальная температура роста  $37-39^{\circ}$ C, pH -3,5-5,5. Характерный продукт брожения — молочная кислота.

Штамм Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607 был выделен из препарата «Пробиотик» и представляет собой грамположительные короткие прямые палочки. На плотной среде образует колонии круглой формы, мягкой консистенции, выпуклые, непрозрачные, пигментов не образуют, диаметр колоний составляет 1-2 мм. При росте на жидкой среде образует свежий кисломолочный запах, помутнение бульона и осадок белого цвета. Максимальный показатель жизнеспособности составляет  $5,6\times10^8$  КОЕ/мл. Имеет высокую степень адгезии. Устойчив к действию 2-6% NaCl и 20% желчи.

Штамм *Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742* был выделен из нефти и представляет собой грамположительные палочки с прямыми концами, размеры 3 мкм. На плотной среде образует округлые, плоские колонии с волнистым краем, шероховатые, пастообразной консистенции, кремового цвета, размером 3-5 мм. При росте на жидкой среде наблюдается помутнение бульона, выпадение осадка. Аэроб, оптимальная температура роста 30°C, рН-5. Галотолерантны в диапазоне 1-9%.

В ходе проведенных экспериментов было доказано, что совместное культивирование данных штаммов является симбиотическим и приводит к снижению органических веществ (по химическому потреблению кислорода (ХПК).

Описание экспериментов:

При составлении консорциумов бактериальных культур в первую очередь их проверяют на отсутствие секреции антибиотических веществ по отношению друг к другу. Примененный нами метод совместного культивирования показал, что культуры Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742, при совместном росте не подавляют друг друга.

В модельных экспериментах было проведено очистка сточной воды канализационных очистных сооружений озера «Талдыколь» консорциума бактериальных штаммов 7BLB на ochobe Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742.

Культуры молочнокислых штаммов (Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607) культивировали раздельным способом на среде MPC (%): дрожжевой экстракт -0,5; мясопептонный бульон -10,0; пептон - 1,0; глюкоза - 2,0; аммоний лимоннокислый - 0,2; натрий уксуснокислый×3H<sub>2</sub>O - 0,5, калий фосфорнокислый 2-х зам. - 0,2; марганец сернокислый - 0,005; магний сернокислый×7H<sub>2</sub>O - 0,02; твин-80 - 0,1; агар — 2;  $H_2O$  дист. - до 100 мл; pH 6,2-6,6. Стерилизация 1,0 атм — 20 мин. Инкубация при 37°C — 24 ч.

Культуры бациллярных штаммов (Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742) культивировали также раздельным способом в питательном бульоне (приготовление по аннотации завода-изготовителя). Инкубация при  $37^{\circ}\text{C} - 24$  ч.

После инкубации штаммов молочнокислых и бациллярных культур микроорганизмов проводили центрифугирование при 4000 об/мин – 20 мин.

Центрифугат молочнокислых и бациллярных штаммов микроорганизмов смешивали в пропорциональном соотношении (Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742).

Для очистки анализируемой воды консорциум молочнокислых и бациллярных культур микроорганизмов (Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742) вносили в количестве 0,1 мас. % к объему воды. Культивирование проводили при 22-23°С и подачей воздуха компрессором 100 л/ час. После 7 суток культивирования определяли химическое потребление кислорода.

В результате было выявлено, что культивирование с консорциумом бактериальных культур микроорганизмов 7BLB (Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742) приводит к снижению органических веществ в сточной воде озера «Талдыколь» (по химическому потреблению кислорода (ХПК).

Сравнительные данные представлены в таблице 1.

Значение ХПК, мг/	Время		
Первоначальное	Контроль (Культивирование без консорциума)	Культивирование с консорциумом 7BLB	культивирования, сутки
47	48	28	7

Преимущество и положительный эффект объясняется тем, что в отличие от прототипов, предлагаемый консорциум для деградации органических

загрязнений, благодаря своему определенному составу эффективных природных микроорганизмов направленного, многофункционального действия обеспечивает усиленную ферментацию органических загрязнений, в том числе трудно разлагающихся, обеззараживает воду за счет заселения полезными микробами - антагонистами патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

В таблице 2 представлена характеристика штаммов консорциума 7BLB.

	В таблице 2 представлена характеристика штаммов консорциума /ВГВ.						
	Название штамма	Номер,	Свойства штамма				
		присвоенный					
п/п		коллекцией					
	Lactococcus lactis	B-RKM 0743	Устойчив к фагам и антибиотикам				
1.	subsp.cremoris BM-1/17						
	Lactobacillus bulgaricus	B-RKM 0745	Обладает антагонистической				
2.	BM-3/17		активностью в отношении				
			грамотрицательных и				
			грамположительных бактерий:				
			Sarcina, Bac. mycoides, St. aureus,				
			E. coli, Proteus, Diplococcus,				
			Salmonella				
	Lactobacillus casei BM-	B-RKM 0746	Обладает антагонистической				
3.	4/17		активностью в отношении				
			грамотрицательных и				
			грамположительных бактерий:				
			Sarcina, Bac. mycoides, St. aureus,				
			E. coli, Proteus, Diplococcus,				
		į	Salmonella				
	Lactobacillus acidophilus	B-RKM 0747	Обладает антагонистической				
4.	BM-5/17		активностью в отношении				
			грамотрицательных и				
			грамположительных бактерий:				
			Sarcina, Bac.mycoides, St.aureus,				
			E.coli, Proteus, Diplococcus,				
			Salmonella				
	Lactobacillus fermentum 9	B-RKM 0607	Обладает антиоксидантной,				
5.	LB		антилизоцимной и				
			протеолитической активностью.				
			Резистентен к канамицину.				
			Обладает антагонистической				
			активностью в отношении $S$ .				
			pyogenes, P. vulgaris, E. coli, Salm.				
			typhimurium, Ser. marcescens.				
	Bacillus subtilis BM-2/17	B-RKM 0744	Способен деструктировать нефть				
6.	Dacillas Suolilla DIVI-2/1/	D-ICIXIVI U/74	и нефтепродукты, поверхностно-				
0.			активные вещества (ПАВ)				
			активные вещества (ПАВ)				

	Bacillus amyloliquefaciens	B-RKM 0742	Обладает	целлюлозолитической
7.	ES-1		активностью	

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было доказано, что полученная устойчивая ассоциация семи культур Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742 является симбиотической и представляет собой новый консорциум бактериальных штаммов, перспективный в качестве основы биопрепарата для очистки водоемов и прудов-накопителей от органических загрязнений.

## Формула изобретения

Консорциум бактериальных культур 7BLB (Lactococcus lactis subsp.cremoris BM-1/17, Lactobacillus bulgaricus BM-3/17, Lactobacillus casei BM-4/17, Lactobacillus acidophilus BM-5/17, Lactobacillus fermentum 9 LB B-RKM 0607, Bacillus subtilis BM-2/17, Bacillus amyloliquefaciens ES-1B-RKM 0742) депонирован B  $P\Gamma\Pi$  «Республиканская коллекция микроорганизмов» под N $\!\!\!$ B-RKM 0748, используемый в качестве основы биопрепарата для очистки водоемов и прудовнакопителей от органических загрязнений.