

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038354**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.12

(21) Номер заявки
201800009

(22) Дата подачи заявки
2017.11.22

(51) Int. Cl. **C02F 3/34** (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C02F 101/32 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ И ВОДЫ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

(31) **2017/0533.2**

(32) **2017.08.16**

(33) **KZ**

(43) **2019.03.29**

(96) **KZ2017/084 (KZ) 2017.11.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТОВАРИЩЕСТВО
С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ЭКОСТАНДАРТ.KZ" (KZ)**

(56) **RU-C2-2365438
RU-C1-2502569
RU-C1-2430021
KZ-A4-25929
US-A1-20080020947**

(72) Изобретатель:
**Молдагулова Назира Балтабаевна,
Сарсенова Айнура Сейтжаппаркызы,
Аюпова Айгуль Жанаевна,
Хасенова Эльмира Жексембаевна,
Бердимуратова Калыш Тлеухановна,
Нурлыбеков Азамат Нурлыбекович
(KZ)**

(57) Изобретение относится к области микробиологии, биотехнологии и экологии, а именно к биоремедиации нефтезагрязненной почвы и воды. Касается получения нового биопрепарата "KazBioRem-K" на основе активных штаммов нефтедеструкторов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K. Повышение эффективности очистки загрязненных нефтью и нефтепродуктами территорий с использованием биопрепаратов с высоким содержанием жизнеспособных клеток активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, удобных в использовании и длительным сроком хранения, является одним из приоритетных направлений охраны окружающей среды. Техническим результатом является получение стабильной формы биологического препарата "KazBioRem-K" на основе активных штаммов нефтедеструкторов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K путем суспендированной биомассы микроорганизмов в водном растворе 5%-ного глицерина и 10%-ного хлорида натрия. Данная форма стабильна и может храниться более 6 месяцев при низких положительных температурах, при этом эффективность препарата при обработке нефтезагрязненной почвы не снижается.

038354 B1

038354

B1

Изобретение относится к области биотехнологии и охраны окружающей среды, в частности к биотехнологическим способам биоремедиации нефтезагрязненных объектов путем внесения биологического препарата "KazBioRem-K" на основе активных штаммов-нефтедеструкторов и может быть использована для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов.

В настоящее время проблеме загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами уделяется большое внимание. Одним из эффективных методов биоремедиации нефтезагрязненных почв и воды является биологический метод с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов. Биологическая очистка почв позволяет не только очищать почву, почвогрунты и почвогрунтовые воды от нефтепродуктов, но и предотвращать дальнейшее распространение загрязнения на прилегающую территорию.

Известен бактериальный препарат для очистки объектов окружающей среды от нефти и нефтепродуктов (патент RU 2138451, МПК В09С 1/10), включающий аэробные нефтеокисляющие бактерии, минеральные добавки и наполнитель.

Известен биопрепарат "Путидойл", предназначенный для ускорения разложения нефти (А.С. SU 1076446, кл. C02F 3/34, 1984).

Данные биопрепараты представлены в виде сухой биомассы микроорганизмов, обезвоженных с использованием лиофильной или термовакuumной сушки. К достоинствам этой формы препаратов относятся длительность их хранения. Однако по результатам многих исследований в высушенной сухой микробной биомассе выживаемость клеток бактерий составляет не более 50%. К тому же сушка микробных клеток - это достаточно энергоемкий процесс, что отражается на себестоимости препаратов. Кроме того, после лиофилизации микроорганизмы могут потерять свои полезные свойства. Также сухой препарат требует подготовки к работе, т.к. микроорганизмы необходимо реактивировать, для чего требуется специальная техника и специалист-микробиолог.

Наиболее удобной для использования является жидкая форма биологических препаратов. Она намного дешевле сухих форм биопрепаратов, не требует специальной подготовки для применения. При этом в жидкой форме выживаемость бактериальных клеток составляет более 90%. Однако жидкие формы препаратов не предназначены для длительного хранения. Титр клеток через месяц хранения резко снижается, так как для поддержания жизнеспособности клеток микроорганизмов необходим доступ кислорода. Для поддержания жизнеспособности клеток в препараты добавляются различные защитные вещества.

Наиболее близким аналогом к настоящей разработке является биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов, известный по патенту RU 2365438 С2. Препарат представлен в жидкой форме и содержит (мас.%): глицерин - 8-10, KNO_3 - 0.360-0.367, KH_2PO_4 - 0.054-0.055, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 0.126-0.128, нефтеокисляющие микроорганизмы - не менее $3 \cdot 10^{10}$ кл/мл и вода. Недостатком метода является то, что препарат необходимо хранить при низких температурах (не выше -10°C), при этом срок хранения препарата менее 2 месяцев.

Задачей изобретения является получение стабильной формы биопрепарата-нефтедеструктора "Kaz-BioRem-K" с высоким титром жизнеспособных клеток и длительным сроком хранения.

Технический результат - получение стабильной формы биологического препарата на основе активных штаммов нефтедеструкторов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K.

Поставленная задача решается тем, что биопрепарат готовят в виде суспензии биомассы клеток в растворе 10%-ного NaCl и 5%-ного глицерина. Хранение препаратов можно осуществлять и при комнатных температурах, что намного облегчает процесс транспортировки и удешевляет стоимость препаратов. Глицерин широко применяется в качестве криопротектора бактериальных клеток, это недорогое и доступное вещество. Кроме защитных функций бактериальных клеток от стрессов, глицерин балансирует осмотическое давление и регулирует трансмембранный транспорт, что решает проблему возможности проявления осмотического шока. Дыхательная активность снижается за счет высокой солености среды.

В качестве нефтеокисляющих бактерий используют сообщество микроорганизмов-нефтедеструкторов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K.

Штамм *Rhodococcus erythreus* AT7 выделен из нефтезагрязненной почвы месторождения Алибек-мола Актюбинской области. Штамм представляет собой подвижные грамположительные палочки размером 2-3 мкм с округленными концами, расположенные одиночно и в скоплениях, растет на жидких и агаризованных средах. Оптимальная температура роста 28°C , длительность культивирования 24-48 ч. Аэроб. способен к росту на средах, содержащих источники углерода. Хорошо утилизирует фруктозу, сорбит, манит, инозит, слабее глюкозу, сахарозу, мальтозу, сукцинат, цитрат и бензоат, активно разлагает тирозин. Колонии микроорганизма круглые, непрозрачные, слизистые, плоские, края ровные, окраска кремовато-розовая. При микроскопическом исследовании культура представлена палочковидными, неравномерными по толщине грамположительными клетками, споры отсутствуют. Штамм не токсичен и не патогенен. Штамм бактерий *Rhodococcus erythreus* AT7 депонирован в РГП "Республиканская коллекция микроорганизмов" КН МОН РК под номером В-RKM-0769.

Штамм *Dietzia maris* 22K выделен из нефтезагрязненной почвы месторождения Кумколь Кызылординской области. Клетки представляют собой грамположительные неподвижные кокки, спор не образуют. На питательном агаре культура образует круглые, выпуклые, оранжевого цвета колонии диаметром

2-3 мм. Край колоний ровный, пигмент в среду не выделяет. Факультативный аэроб. штамм не токсичен и не патогенен. Физиолого-биохимические признаки. В качестве источника углерода использует глюкозу, сахарозу, арабинозу, ксилозу. Крахмал не гидролизует, желатин не разжижает. Сероводород и индол не образует. Нитраты восстанавливает до нитритов. Дает положительную реакцию на каталазу и отрицательную на оксидазу. Штамм характеризуется высокой способностью к утилизации нефти и нефтепродуктов. Штамм бактерий *Dietzia maris* 22K депонирован в РГП "Республиканская коллекция микроорганизмов" КН МОН РК под номером В-РКМ-0768.

Сущность изобретения поясняется следующими конкретными примерами, где биопрепарат-нефтедеструктор характеризуется стабильной, нативной формой на основе штаммов микроорганизмов с высоким титром жизнеспособных клеток и длительным сроком хранения.

Пример 1. Приготовление препарата "KazBioRem-K". Штаммы *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K выращивали в колбе в жидкой питательной среде. В период наступления стационарной фазы полученную культуральную жидкость центрифугировали при 7000 об/мин. Далее осадок промывали 1%-ным раствором NaCl и центрифугировали. Для формирования биопрепарата "KazBioRem-K" осажденную биомассу растворяли в 10%-ном растворе NaCl с добавлением 5%-ного глицерина.

Пример 2. Биопрепарат, полученный по методике, описанной выше, хранили при температуре -20°C в течение 12 месяцев и при +4°C в течение 6 месяцев. Каждый месяц определяли титр клеток методом Коха. Выживаемость клеток штаммов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K в водных растворах NaCl с добавлением 5%-ного глицерина через 6 месяцев хранения определяли по отношению значения десятичного логарифма титра клеток в препарате после хранения к значению десятичного логарифма начального титра клеток бактерий.

Пример 3. В плашки размером 10×15 см помещали по 200 г почвы, загрязненной нефтью до концентрации 5 г/100 г. В плашки вносили по 2 мл биопрепарата, приготовленного, как указывалось в примере 1, почву увлажняли водой до 60% полной влагоемкости почвы. Инкубировали в течение 2 месяцев при температурах от 15 до 35°C. Очищаемую почву регулярно перемешивали, влажность поддерживали на начальном уровне. Степень деструкции нефтепродуктов определяли после 15 и 30 суток эксперимента (табл. 2). В качестве контроля использовали плашки с нефтезагрязненной почвой без внесения препарата.

Пример 4. Нефтеокисляющую активность свежеприготовленных препаратов после 6 месяцев хранения определяли в лабораторных условиях на минеральной среде Ворошиловой-Диановой с 5%-ной нефтью.

Опыты проводили в 250 мл колбах, в которые заливали по 100 мл минеральной среды Ворошиловой-Диановой и добавляли 5 г нефти. Далее в колбы вносили по 0,1 мл препарата и ставили на качалки при температуре 28°C при 150 об/мин. Содержание нефти определяли гравиметрическим методом на 7-й день культивирования микроорганизмов (табл. 3).

Таблица 1. Выживаемость клеток штаммов *Rhodococcus erythreus* AT7 и *Dietzia maris* 22K в водных растворах NaCl с добавлением 5%-ного глицерина через 12 и 6 месяцев хранения

Температура хранения препарата	Титр клеток, кл/мл		Выживаемость клеток, %
	Исходное	через 12 и 6 месяцев хранения	
-20°C	$(4,31 \pm 0,13) \cdot 10^{10}$	$(3,54 \pm 0,12) \cdot 10^{10}$	99,2
+4°C		$(2,31 \pm 0,10) \cdot 10^{10}$	97,5

Таблица 2. Нефтеокисляющая активность биопрепарата "KazBioRem-K" в почве

Варианты	Степень деструкции нефти, %	
	через 15 суток	через 30 суток
Контроль	6,3	7,5
Биопрепарат	75	91

Таблица 3. Нефтеокисляющая активность свежеприготовленных препаратов и после 6 месяцев хранения

Варианты	Количество нефти, мг/кг		Степень деструкции, %
	общее	остаточное	
Свежеприготовленный препарат	5	0,92	81,6
Препарат, после 6 месяцев хранения	5	0,35	93

Таким образом, получена стабильная жидкая форма биопрепарата-нефтедеструктора "KazBioRem-K", которая может храниться при низких положительных температурах более 6 месяцев. При этом деструкция нефти после 6 месяцев хранения повышается на 11,4%, что объясняется эффектом голодания клеток микроорганизмов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Биологический препарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов, включающий клетки аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов штамма *Rhodococcus erythreus* AT7, депонированного в "Республиканской коллекции микроорганизмов" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан под номером доступа В-RKM 0769, и штамма *Dietzia maris* 22К с номером доступа В-RKM 0768, суспендированные в водном растворе 5%-ного глицерина и 10%-ного хлорида натрия.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
