

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043191**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.04.27**

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

(21) Номер заявки  
**202292384**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.09.17**

---

### (54) ШТАММ БАКТЕРИЙ RHODOCOCCLUS DEGRADANS НЗЗ АС-2901D - ДЕКТРУКТОР НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

---

(31) **2021121501**

(56) **RU-C2-2365438**

(32) **2021.07.19**

**EP-A1-0668246**

(33) **RU**

**CN-A-106754499**

(43) **2023.01.31**

**CN-A-101580808**

**US-B1-20170151593**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

LEE M. et al.: Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified Rhodococcus baikonurensis EN3 in the presence of mycolic acid. J APPL MICROBIOL. 2006;100(2):325-333.doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02756.x, весь текст

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"АВИАХИМ" (RU)**

(72) Изобретатель:

SORKHOV N.A.et al.: Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of Rhodococcus rhodochrous isolated from soil and marine environments in Kuwait. ENVIRON POLLUT. 1990; 65(1):1-17. doi:10.1016/0269-7491(90)90162-6, весь текст

**Четвериков Сергей Павлович,  
Назаров Алексей Михайлович,  
Давлетшин Тимур Касимович (RU)**

(74) Представитель:

**Имансаева А.М. (KZ)**

(57) Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, может быть использовано при биологической очистке воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. Штамм бактерий Rhodococcus degradans НЗЗ депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) под регистрационным номером Ас-2901D. Штамм может быть использован для деструкции нефти и нефтепродуктов в диапазоне рН среды от 4,5 до 11,0. Изобретение позволяет повысить эффективность мероприятий по деструкции нефти и нефтепродуктов в диапазоне рН среды от 4,5 до 11,0.

**043191**

**B1**

**043191**

**B1**

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, представляет собой новый бактериальный штамм *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D - деструктор нефти и нефтепродуктов, который может быть использован для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов.

В настоящее время загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами является одной из актуальных проблем. При этом остается открытым вопрос их биологической деструкции при помощи микроорганизмов, способных окислять нефтяные углеводороды в широком диапазоне pH 4-11 (так как многие нефтезагрязнения в Западной Сибири локализованы в кислых средах, а для загрязнений южных регионов России характерны щелочные значения pH) [1].

Известны штаммы *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus luteus*, *Micrococcus flavus* [2], которые осуществляют деструкцию нефтепродуктов в ассоциации, что увеличивает затраты на изготовление конечного препарата.

Известен штамм *Bacillus species* 739 [3] и полученный на его основе бактериальный препарат "Бациспецин" [4], используемый для рекультивации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Недостатком штамма является его низкая эффективность, особенно в условиях высокого содержания нефти и нефтепродуктов в углеводородсодержащем субстрате, отсутствует информация о pH - стабильности бактериальной культуры и ее рабочем диапазоне pH.

Большая эффективность в условиях низких положительных температур установлена для штамма *Rhodococcus erythropolis* E-17 [5] при биодеградациии нефти, без указания рабочего диапазона pH утилизации нефтепродуктов.

Наиболее близким аналогом является штамм *Rhodococcus jialingiae* Б-М-1 - деструктор нефтяных углеводородов, депонированный во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номером Ac-1967 [6], жизнеспособный до значения pH 9. Недостатком данного штамма является отсутствие информации о диапазоне pH, в котором проявляется его нефтеокисляющая способность.

Целью изобретения является расширение номенклатуры штаммов нефтедеструкторов, обладающих утилизирующей способностью по отношению к нефти и нефтепродуктам в широком диапазоне pH (от 4,5 до 11).

Полученный штамм выделен из нефтезагрязненной почвы Республики Башкортостан.

Полученный штамм депонирован во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук под регистрационным номером ВКМ Ac-2901D и характеризуется следующими признаками:

Клетки штамма - подвижные палочки изменчивые по Граму, встречающиеся преимущественно парами и нерегулярными скоплениями, не спорообразующие. Небольшие непрозрачные, круглые колонии с ровными краями с бледно-лососево-розовым пигментом диаметром 1,0-2,5 мм (на питательном агаре). Оптимальная температура роста 26-28°C. Не растут при 37°C. Рост при температурах от 15 до 30°C, pH от 4,5 до 11 и концентрации хлорида натрия до 7%. Положительные признаки: каталаза, оксидаза, гидролиз желатина и казеина, утилизация цитрата, индола, фосфатазная активность, образование H<sub>2</sub>S, использует малонат в качестве источника углерода. Отрицательные признаки: активности лизин-декарбоксилазы, уреазы, лецитиназы, нитратредуктазы, утилизация крахмала.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16S рРНК с известными структурами из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), позволяет утверждать, что микроорганизм относится к виду *Rhodococcus degradans* (обнаружено 100% сходства с типовым штаммом вида *Rhodococcus degradans* CCM 4446<sup>T</sup>).

Хранится на косяках МПА и в лиофилизированном состоянии при температуре +4°C.

Пример 1. Приготовление препарата на основе микробных клеток *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D

Культуру *Rhodococcus degradans* H33 выращивают на питательной среде следующего состава, г/л: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 0,1; CaCl<sub>2</sub> - 0,01; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,02; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,02; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,2; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 2,0; пептон - 1,0; дизельное топливо - 10; вода дистиллированная - 1000 мл при температуре 26±2°C в течение 72-96 ч. Полученную нативную культуру, содержащую не менее 1·10<sup>9</sup> живых микробов в 1 см<sup>3</sup>, используют в качестве биологического препарата для оценки деструктивной активности в отношении нефти и нефтепродуктов при различных значениях pH.

Пример 2. Исследование нефтеокисляющей активности штамма *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D в отношении нефти и нефтепродуктов при загрязнении воды при различных значениях pH

Для определения биодеградационной активности штамма *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D в отношении нефти, дизельного топлива и мазута в воде при кислом (pH 4,5), нейтральном (pH 6,86) и щелочном (pH 11,0) значениях pH готовят минимальную солевую среду (пропись среды изложена в примере 1), разливают в лабораторные колбы емкостью 250 см<sup>3</sup> по 100 см<sup>3</sup> и доводят до нужной кислотности. Затем в отдельные колбы вносят нефть, дизельное топливо, мазут в количестве 10,0 г/л среды и нативную культуру штамма *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D (по примеру 1) в количестве, обеспечивающем конечную биологическую концентрацию в смеси 1·10<sup>7</sup> живых микробных клеток. В качестве контроля параллельно ставят аналогичные пробы без внесения микробной культуры. Затем пробы выдержи-

вают на термостатируемой качалке при температуре  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании 180 об/мин в течение 7 сут.

Концентрацию нефтепродуктов в пробах воды определяют с использованием анализатора жидкости Флюорат-02 согласно ПНДФ 14.1 2 4.128-98; Методика измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природных, питьевых, сточных вод на анализаторе жидкости Флюорат-02 (М 01-05-2012).

Утилизация (нефтеокисляющая активность) составила:

при pH 4,5 в отношении нефти, дизельного топлива и мазута соответственно 54,5, 58,0 и 32,6% (в контроле менее 1,0%);

при pH 6,86 в отношении нефти, дизельного топлива и мазута соответственно 98,6, 99,6 и 68,6% (в контроле менее 1,8%);

при pH 11,0 в отношении нефти, дизельного топлива и мазута соответственно 88,6, 92,2 и 60,3% (в контроле менее 1,0%).

Пример 3. Исследование нефтеокисляющей активности штамма *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D в отношении нефти и нефтепродуктов при загрязнении почвы при различных значениях pH

Определение биодegradационной активности штамма *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D в отношении нефти, дизельного топлива и мазута при загрязнении почвы при кислотом (pH 4,5), нейтральном (pH 6,86) и щелочном (pH 11,0) значениях pH проводят следующим образом. Доводят pH почвы с остаточной влажностью 50-60% до нужной кислотности и фасуют по 1 кг в сосуды емкостью 1,5 дм<sup>3</sup>. Затем в отдельные сосуды вносят нефть, дизельное топливо, мазут в количестве 80 г/кг почвы и нативную культуру штамма *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D (по примеру 1) из расчета конечной концентрации  $1 \cdot 10^7$  живых микробных клеток на 1 г загрязненной почвы. Приготовленные пробы выдерживают при температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 2 месяцев. В качестве контроля параллельно ставят аналогичные пробы без внесения микробной культуры. Остаточную влажность поддерживают орошением водопроводной водой на протяжении срока наблюдения.

Концентрацию нефтепродуктов в пробах почвы определяют в соответствии с ПНД Ф 16.1.41-2004 "Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом".

Утилизация (нефтеокисляющая активность) составила:

при pH 4,5 в отношении нефти, дизельного топлива и мазута соответственно 65,8, 68,9 и 39,5% (в контроле менее 2,0%);

при pH 6,86 в отношении нефти, дизельного топлива и мазута соответственно 87,5, 95,6 и 58,4% (в контроле менее 2,8%);

при pH 11,0 в отношении нефти, дизельного топлива и мазута соответственно 80,2, 82,5 и 50,4% (в контроле менее 2,0%).

Таким образом, преимуществом заявляемого штамма является то, что он обладает высокой утилизирующей способностью по отношению как к нефти, так и к нефтепродуктам в относительно короткие сроки (от 7 суток до 2 месяцев) в широком диапазоне pH среды (от 4,5 до 11,0), который может быть использован для очистки почв и воды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами (дизельное топливо, мазут).

#### Список литературы

1. Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е., Забелин В.А., Гафаров А.Б., Соколов С.Л., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Боронин А.М.: Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводородов нефти // Изв. Тульского Гос. Ун-та. Естественные науки. 2013. Вып. 2, ч. 1. сс. 241-257.
2. Патент СССР № 1493666, кл. C12N 1/20, C02F 3/34, C02F 101/32, C02F 103/06, C12R 1/01, C12R 1/27, 1989.
3. Авторское свидетельство СССР № 1743019, кл. C12N 1/20, 1989.
4. Патент РФ № 2077397, кл. C09K 3/32, 1997.
5. Патент РФ № 2019527, кл. C02F 3/34, 1994.
6. Патент РФ № 2618838, кл. C12N 1/20, B09C 1/10, C02F 3/34, C12R 1/01, 2016.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм бактерий *Rhodococcus degradans* H33 Ac-2901D - деструктор нефти и нефтепродуктов.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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