

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292384** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.01.31

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

(22) Дата подачи заявки
2022.09.17

(54) **ШТАММ БАКТЕРИЙ Rhodococcus degradans НЗЗ Ас-2901D - ДЕСТРУКТОР НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ**

(31) **2021121501**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.07.19**

Четвериков Сергей Павлович,

(33) **RU**

Назаров Алексей Михайлович,

(71) Заявитель:

Давлетшин Тимур Касимович (RU)

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"АВИАХИМ" (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.

202292384

A1

A1

202292384

ШТАММ БАКТЕРИЙ *Rhodococcus degradans* НЗЗ Ас-2901D - ДЕСТРУКТОР НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, представляет собой новый бактериальный штамм *Rhodococcus degradans* НЗЗ Ас-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 рН 4–11 (так как многие нефтезагрязнения в Западной Сибири локализованы в кислых средах, а для загрязнений южных регионов России характерны щелочные значения рН) [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 «Бациспектин» [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 рН – стабильности бактериальной культуры и ее рабочем диапазоне рН.

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

Наиболее близким аналогом является штамм *Rhodococcus jialingiae* Б-М-1 - деструктор нефтяных углеводородов, депонированный во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номером Ас-1967 [6], жизнеспособный до значения рН 9. Недостатком данного штамма является отсутствие информации о диапазоне рН, 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 рН (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. Скрыбина Российской академии наук под регистрационным номером ВКМ Ас-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, рН от 4,5 до 11 и концентрации хлорида натрия до 7%. Положительные признаки: каталаза, оксидаза, гидролиз желатина и казеина, утилизация цитрата, индола, фосфатазную активность, образование H₂S, 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* ССМ 4446^Т).

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

Пример 1. Приготовление препарата на основе микробных клеток *Rhodococcus degradans* Н33 Ас-2901D.

Культуру *Rhodococcus degradans* Н33 выращивают на питательной среде следующего состава, г/л: Na₂CO₃ – 0,1; CaCl₂ – 0,01; MnSO₄•7H₂O – 0,02; FeSO₄•7H₂O – 0,02; NaH₂PO₄ – 1,5; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄•7H₂O – 0,2; NH₄NO₃ – 2,0; пептон – 1,0; дизельное топливо – 10; вода дистиллированная – 1000 мл при температуре 26±2°C в течение 72-96 часов. Полученную нативную культуру, содержащую не менее 1·10⁹ живых микробов в 1 см³, используют в качестве биологического препарата для оценки деструктивной активности в отношении нефти и нефтепродуктов при различных значениях рН.

Пример 2. Исследование нефтеокисляющей активности штамма *Rhodococcus degradans* Н33 Ас-2901D в отношении нефти и нефтепродуктов при загрязнении воды при различных значениях рН.

Для определения биодegradационной активности штамма *Rhodococcus degradans* Н33 Ас-2901D в отношении нефти, дизельного топлива и мазута в воде при кислом (рН 4,5), нейтральном (рН 6,86) и щелочном (рН 11,0) значениях рН готовят минимальную солевую среду (пропись среды изложена в примере 1), разливают в лабораторные колбы емкостью 250 см³ по 100 см³ 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* Н33 Ас-2901D (по примеру 1) в количестве, обеспечивающем конечную биологическую концентрацию в смеси 1·10⁷ живых микробных клеток. В качестве контроля параллельно ставят аналогичные пробы без внесения микробной культуры. Затем пробы

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

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

при рН 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* Н33 Ас-2901D в отношении нефти и нефтепродуктов при загрязнении почвы при различных значениях рН.

Определение биодеградационной активности штамма *Rhodococcus degradans* Н33 Ас-2901D в отношении нефти, дизельного топлива и мазута при загрязнении почвы при кислотном (рН 4,5), нейтральном (рН 6,86) и щелочном (рН 11,0) значениях рН проводят следующим образом. Доводят рН почвы с остаточной влажностью 50-60% до нужной кислотности и фасуют по 1 кг в сосуды емкостью 1,5 дм³. Затем в отдельные сосуды вносят нефть, дизельное топливо, мазут в количестве 80 г/кг почвы и нативную культуру штамма *Rhodococcus degradans* Н33 Ас-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 рН 4,5 в отношении нефти, дизельного топлива и мазута соответственно 65,8%, 68,9% и 39,5% (в контроле менее 2,0 %);

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

при рН 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 рН 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. С. 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. C 12 N 1/20, 1989.
4. Патент РФ № 2077397, кл. C 09 K 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* НЗЗ Ас-2901D - деструктор нефти и нефтепродуктов.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202292384

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 1/20 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 1/20, C02F 3/34, B09C 1/10

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Patentscope, Espacenet, Pubmed, БД ФИПС, ЕАПАТИС, USPTO

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2365438 C2 (КАРАСЕВА Э.В. и др.) 2008-01-10 весь текст	1
A	EP 0668246 A1 (МУРАКОВ Б. Г.) 1995-08-23 весь текст	1
A	CN 106754499 A (QINZHOU UNIVERSITY) 2017-05-31 весь текст	1
A	CN 101580808 A (SHANTOU UNIVERSITY) 2009-11-18 весь текст	1
A	US 20170151593 B1 (WAN-LAN CHAI et al.) 2017-06-01 весь текст	1
A	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	1
A	SORKHOH N.A. et al. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of Rhodococcus rhodochromus 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	1

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **30/11/2022**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины


А.В. Чебан