



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016133633, 16.08.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 16.08.2016

Дата регистрации:
 28.07.2017

Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 16.08.2016

(45) Опубликовано: 28.07.2017 Бюл. № 22

Адрес для переписки:
 420032, г. Казань, ул. Краснококшайская, 92, кв.
 14, Лайкову А.В.

(72) Автор(ы):

Лайков Александр Владимирович (RU),
 Хиляс Ирина Валерьевна (RU),
 Григорьева Татьяна Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
 Научно-производственное предприятие
 "Экоселект" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2180276 C1, 10.03.2002. RU
 2361686 C2, 20.07.2009. RU 2160718 C1,
 20.12.2009. RU 2023686 C1, 30.11.1994.

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ TSUKAMURELLA TYROSINOSOLVENS ВКПМ В-12342 - ДЕСТРУКТОР АЛКАНОВ И ПРОДУЦЕНТ БИОПАВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРРИТОРИЙ, АКВАТОРИЙ И ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ ОТ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Штамм бактерий *Tsukamurella tyrosinosolvans* PS2 обладает способностью утилизировать алифатические углеводороды и продуцировать биологически поверхностно-активные вещества. Штамм бактерий депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов

под регистрационным номером ВКПМ В-12342 и может использоваться для очистки территорий и акваторий, загрязненных нефтяными углеводородами. Изобретение позволяет повысить эффективность очистки территорий и акваторий от нефтезагрязнений. 4 пр.

RU 2 626 593 C1

RU 2 626 593 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2016133633, 16.08.2016**(24) Effective date for property rights:
16.08.2016Registration date:
28.07.2017

Priority:

(22) Date of filing: **16.08.2016**(45) Date of publication: **28.07.2017** Bull. № 22

Mail address:

**420032, g. Kazan, ul. Krasnokokshajskaya, 92, kv.
14, Lajkovu A.V.**

(72) Inventor(s):

**Lajkov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Khilyas Irina Valerevna (RU),
Grigoreva Tatyana Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
Nauchno-proizvodstvennoe predpriyatie
"Ekoselekt" (RU)**

(54) **BACTERIAL STRAIN TSUKAMURELLA TYROSINOSOLVENS VKPM V-12342 - DESTRUCTOR OF ALKANES AND BIOSAS PRODUCER FOR CLEANING TERRITORIES, WATER AREAS AND INDUSTRIAL WASTE FROM OIL POLLUTANTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: Tsukamurella tyrosinosolvens PS2 bacterial strain is able to utilise aliphatic hydrocarbons and produce biologically surface-active substances. The bacterial strain is deposited in the Russian National Collection of Industrial Microorganisms under accession

number VKPM B-12342 and may be used for cleaning territories and water areas contaminated with oil hydrocarbons.

EFFECT: increased efficiency of territories and water areas cleaning from oil contaminations.

4 ex

RU 2 626 593 C1

RU 2 626 593 C1

Изобретение относится к области биохимии и микробиологии и может быть использовано в экологических биотехнологиях для очистки загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв, водоемов, для переработки нефтехимических отходов.

Неснижающаяся зависимость мировой промышленности от углеводородного сырья обуславливает увеличение объемов добычи нефти и природного газа, что неизбежно сопровождается как сопутствующим загрязнением окружающей среды, так и накоплением отходов нефтехимического производства. Существуют различные способы переработки углеводородсодержащих отходов и восстановления загрязненных нефтью природных сред, особое место среди которых занимают биотехнологические методы с использованием микроорганизмов, вследствие экологической безопасности и, зачастую, низкой стоимости. Широкие метаболические возможности микроорганизмов позволяют создавать биопрепараты, действенные в самых неблагоприятных условиях - от низких температур до высокого осмотического давления и сопутствующего загрязнения тяжелыми металлами.

Известен штамм бактерий *Pseudomonas stutzeri* MEV-S1 [1], способный утилизировать нефть, мазут, дизельное топливо при очистке почвы, поверхностных и грунтовых вод. Недостатком штамма [1] является отсутствие адгезии клеток штамма к углеводородам, вследствие чего при очистке воды требуется интенсивное перемешивание (200 оборотов/мин) для достижения контакта клеток микроорганизма с углеводородами на поверхности жидкости, а также для повышения аэрации. Данное ограничение делает штамм [1] малоэффективным при очистке открытых водоемов.

Известен биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов [2], содержащий ассоциацию 4 родов и 8 видов нефтеокисляющих микроорганизмов: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Actinomyces griseus*, *A. glaucus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. mesentericus*, *P. denitrificans*, *Arthrobacter globiformis*, сорбированных на сферозоле. Помимо увеличения трудозатратности получения биопрепарата, связанного с этапом иммобилизации клеток на носителе, недостатком состоящего из нескольких видов бактерий биопрепарата [2] является сложность обеспечения качества конечного продукта. Незначительные отклонения в количестве засеваемого материала или вариации условий культивирования неизбежно приводят к нарушению соотношения различных штаммов в составе готового биопрепарата. Непостоянство микробного состава готового продукта, в свою очередь, ведет к непредсказуемому поведению биопрепарата в ходе очищения объектов окружающей среды, вплоть до значительного снижения эффективности его применения.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению прототипом является олеофильный биопрепарат, используемый для очистки нефтезагрязненной почвы [3]. В состав биопрепарата входят два штамма: *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 708 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 327. Штаммы обладают адгезией к углеводородам, что позволяет им концентрироваться в гидрофобном слое культуральной жидкости. После удаления водной фракции, к оставшейся суспензии, содержащей углеводороды и клетки микроорганизмов, добавляют минеральные соли азота, фосфора, калия и биосурфактант *Rhodococcus*. Недостатком прототипа [3] является узость области его применения - только для очистки загрязненных почв. Кроме того, для производства биопрепарата необходимо дополнительно получать биосурфактант *Rhodococcus*, что значительно усложняет и удорожает технологию производства. Для прототипа [3] также характерен недостаток аналога [2], поскольку прототип состоит из нескольких штаммов микроорганизмов.

Целью заявляемого изобретения является повышение эффективности очистки территорий и акваторий, загрязненных нефтяными углеводородами, интенсификация

процессов переработки нефтехимических отходов, повышение результатов природоохранной деятельности.

Цели достигаются путем применения штамма *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342.

5 Штамм бактерий *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342, обладающий адгезией к углеводородам, - деструктор алканов и продуцент биоПАВ, применяемый для очистки почв, нефтешламов, пресноводных и морских акваторий от нефтяных загрязнений.

Описание штамма [4]

10 Штамм бактерий *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМВ-12342 выделен из твердых отходов нефтехимического предприятия на питательной минеральной среде (далее по тексту - МС) следующего состава (г/дм³): (NH₄)₂SO₄ - 1,0; MgSO₄×7H₂O - 0,25; КН₂РО₄ - 3,0; Na₂НРО₄×12Н₂О - 4,5; агар-агар - 20,0, вода дистиллированная - до 1 дм³; рН - 7,2. В качестве единственного источника углерода и энергии питательная среда содержала 15 10% об. гексадекана.

Заявляемый штамм депонирован [5] во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИгенетика под номером В-12342. Для штамма характерны следующие признаки.

20 Морфологические признаки. Клетки заявляемого штамма в суточной культуре представлены грамположительными палочками, расположенными попарно или поодиночке, на жидких средах клетки собраны в группы. Диаметр клеток 0,4-0,6 мкм, длина клеток 1,5-2,0 мкм. Клетки неподвижные, спор не образуют.

Культуральные признаки. Штамм - аэроб, гетеротроф. Оптимальное значение температуры для культивирования от плюс 25°С до плюс 30°С. Оптимальное значение рН 6,5-7,5. При выращивании на мясо-пептонном агаре через 2 суток (48 часов) образует 25 сухие морщинистые колонии, с неровным краем и шероховатой поверхностью, кремового цвета. На мясо-пептонном бульоне растет в виде агрегатов, равномерную суспензию не образует. Штамм сохраняет активность при содержании соли NaCl до 3,5%, вследствие чего может быть использован для очистки морских акваторий.

30 Физиолого-биохимические признаки. Штамм гидролизует тирозин и гипоксантин, не гидролизует мочевины. Способен метаболизировать глюкозу, сахарозу, трегалозу, фруктозу и ксилозу. Штамм - прототроф, в дополнительных факторах роста не нуждается. Штамм не является зоопатогенным, штамм не является фитопатогенным, токсины не продуцирует. На основании изучения указанных выше признаков, а также 35 анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамм идентифицирован как *Tsukamurella tyrosinosolvens*.

Биотехнологические свойства. Заявителем проведен анализ штамма бактерий *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМВ-12342 и выявлена совокупность биотехнологически ценных свойств:

40 - способность утилизировать среднецепочечные алифатические углеводороды (C₆-C₁₅);

- способность утилизировать длинноцепочечные алифатические углеводороды (от C₁₆ и выше);

45 способность продуцировать биологические поверхностно-активные вещества (далее по тексту - биоПАВ);

- высокая адгезия клеток к алифатическим углеводородам.

Способность к деградации среднецепочечных алифатических углеводородов установлена газохроматографическим методом по убыли субстрата (углеводородов)

из среды культивирования. Штамм полностью утилизирует вазелиновое масло в концентрации 3 мМ (3 ммоль/л) за 50 часов культивирования на жидкой минеральной среде, при исходном содержании штамма $5 \cdot 10^6$ клеток/мл.

5 Способность к утилизации длинноцепочечных алифатических углеводов установлена по способности штамма образовывать зоны разрушения парафиновой пластинки (толщина пластинки 1-2 мм), находящейся в жидкой минеральной среде, содержащей $5 \cdot 10^6$ клеток/мл штамма в течение 9 суток.

10 Способность продуцировать биоПАВ установлена по снижению поверхностного натяжения культуральной жидкости при культивирования на минеральной среде, содержащей 10% гексадекана. В тесте на растекание капли культуральной жидкости на гидрофобной поверхности (парафиновая пленка) диаметр капли увеличивался в 1,5-1,8 раз по сравнению с контролем (минеральная среда). Эмульгирующую активность трехсуточной культуры определяли по индексу эмульгирования. Для этого смешивали 15 6 мл гексадекана и 4 мл культуральной жидкости без клеток, суспензию перемешивали. Индекс вычисляли как отношение высоты слоя эмульсии к общей высоте жидкости в пробирке после инкубации. Таким образом, заявляемый штамм продуцирует биоПАВ, снижающие поверхностное натяжение и обладающие эмульгирующей активностью.

20 Степень адгезии клеток заявляемого штамма к углеводам установлена по оптической плотности гидрофобной фракции, полученной после добавления гексадекана к буферному раствору. Буферный раствор содержал клетки штамма, выращенные на минеральной среде в присутствии различных источников углерода. При наращивании биомассы штамма на жидкой минеральной среде с гексадеканом адгезия клеток к гидрофобному субстрату увеличивалась в 2,2-2,5 раз, по сравнению с содержащей 25 глюкозу минеральной средой.

30 Высокая адгезия клеток к гидрофобному субстрату и способность к продукции биоПАВ повышает эффективность биоремедиации загрязненных всплывающими углеводородами и маслами водоемов, поскольку клетки вместе с синтезированными биоПАВ концентрируются в загрязненной зоне - поверхностной пленке, и не распределяются по всей толще водоема. Таким образом, данный штамм может быть 35 использован в очистке загрязненных водоемов без применения специальных всплывающих сорбентов и без внесения дополнительных биоПАВ, что является преимуществом по сравнению с прототипом.

40 Условия хранения. Для хранения до 6 месяцев штамм выращивают на твердой питательной среде (мясо-пептонный бульон с добавлением 10% агар-агара) в течение 2 суток, заливают вазелиновым маслом, хранят при плюс 4°C . Для длительного хранения (до 2 лет) штамм выращивают в течение 2 суток на мясо-пептонном бульоне, смешивают с глицерином в соотношении 1:1, хранят при температуре минус 70°C . Штамм не теряет жизнеспособность при высушивании. Возможность реализации предлагаемого 45 изобретения для очистки почв, воды и переработки отходов демонстрируется следующими примерами.

Пример 1. Очистка нефтезагрязненных почв с использованием штамма *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМВ-12342

45 Клетки штамма наращивали, например, на жидкой минеральной среде (г/дм^3): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; KH_2PO_4 - 3,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 4,5 с добавлением 1-10% об. гексадекана в течение 3-5 суток до концентрации 10^8 клеток/мл. Перед использованием полученную суспензию, содержащую активные клетки штамма и секретированные ПАВ, тщательно перемешивали.

Доза внесения суспензии штамма при слое загрязненной почвы - до 30 см и обеспечении кислородного режима (в виде рыхления) составляла 0,25 л на 1 м². Процедуру внесения штамма повторяли еженедельно в течение 2 месяцев. При содержании нефти до 10% убыль нефтяных углеводородов, оцененная методом ИК-спектроскопии, составляла 99%, что в 2,1-2,2 раза выше чем в контроле (загрязненной почве без внесения штамма). При содержании нефти от 10% до 30% убыль нефтяных углеводородов составляла 80-87%. При содержании нефтепродуктов свыше 30% убыль загрязнения составила 60% (по сравнению с контролем), при этом применение штамма сопровождалось дополнительным внесением структурирующих агентов (измельченная солома, опилки).

Пример 1 показывает, что применение штамма ускоряет процесс очистки нефтезагрязненной почвы в 2,1-2,2 раза (по сравнению с контролем) и обеспечивает снижение уровня углеводородов на 80-99% в зависимости от уровня загрязнения.

Пример 2. Снижение уровня углеводородного загрязнения нефтешламов с использованием штамма *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342

Эксперимент проводили как в Примере 1, но вместо нефтезагрязненной почвы использовали нефтехимический шлам, отличающийся высокой токсичностью для микроорганизмов, растений и животных, содержащий до 250 г/кг нефтяных углеводородов. В контроль вносили стерильную минеральную среду, не содержащую клеток штамма. После 2 месяцев обработки, как в Примере 1, содержание нефтяных углеводородов снизилось на 30-36%, что в 1,5-2,0 раза выше чем в контроле.

Пример 2 показывает, что штамм может быть применен в условиях высокой токсичности для очистки нефтешламов.

Пример 3. Очистка загрязненной нефтью воды с использованием штамма *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342

Суспензию штамма готовили, как в Примере 1.

В стеклянную емкость вносили речную воду, высота уровня воды составляла 4 см, площадь поверхности воды - 50 см². На поверхность воды наносили 1 см³ нефти и выдерживали 1 час для формирования нефтяной пленки. На поверхность жидкости наносили 1 см³ суспензии штамма. Через 7 суток инкубации при температуре плюс 25°C, без перемешивания, измеряли содержание углеводородов методом ИК-спектроскопии. Снижение уровня углеводородов составило 90-97%, что в 9-10 раз выше по сравнению с контролем (загрязненная вода без добавления клеток штамма).

Пример 3 показывает, что штамм *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342 эффективен для очистки поверхности нефтезагрязненных пресноводных акваторий.

Пример 4. Очистка штаммом *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342 загрязненной нефтью морской воды.

Эксперимент проводили, как в Примере 3, но вместо речной воды использовали искусственную морскую воду с содержанием солей 3,5%. Через 7 суток инкубации снижение уровня углеводородов составило 80-85%, что в 9-10 раз выше чем в контроле (загрязненная искусственная морская вода без добавления клеток штамма).

Пример 4 показывает, что штамм *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342 применим для очистки поверхности нефтезагрязненных морских акваторий.

Приведенные примеры применения предлагаемого изобретения показывают его эффективность для природоохранной деятельности.

Анализ свойств штамма *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342 позволил выявить его преимущества по сравнению с прототипом:

- заявляемый штамм способен продуцировать ПАВ и не нуждается во внесении дополнительных ПАВ, в отличие от прототипа;

- штамм способен сохранять активность при высоком содержании токсичных для микроорганизмов углеводов и может быть применен для очистки нефтешламов, когда прототип не может быть использован;

- штамм обладает высокой адгезией к гидрофобным субстратам и может быть использован для очистки поверхностного нефтяного загрязнения пресных акваторий;

- штамм сохраняет активность при повышенном содержании солей и может быть использован для очистки поверхностного нефтяного загрязнения морских акваторий.

Предлагаемое изобретение удовлетворяет критериям новизны, так как заявляемый штамм существенно эффективнее известных из уровня техники аналогов и прототипа. Приведенные результаты применения заявляемого изобретения подтверждают возможность его реализации с использованием стандартных технических устройств и оборудования для природоохранных работ. Это соответствует предъявляемому к изобретениям критерию «промышленная применимость». Кроме этого, заявляемое изобретение снижает энерго-, трудо- и ресурсозатраты для получения биопрепарата на его основе, т.к. не требует внесения иммобилизационных агентов, ПАВ и основан на монокультуре микроорганизмов, что упрощает его культивирование.

Использованные источники

1. Патент РФ «Штамм бактерий *Pseudomonas stutzeri* MEV-S1, используемый для очистки почв, грунтов и поверхностных вод от нефти и продуктов ее переработки». RU 2228952, МПК С 12N 1/20, С 02F 3/34, С 02F 101/32, В 09С 1/10, С 12R 1/38. Приоритет от 23.08.2002. Оpubл. 20.05.2004.

2. Патент РФ «Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов». RU 2361686, МПК В 09С 1/10 (2006.01), С 02F 3/34 (2006.01), С 12N 1/26 (2006.01). Приоритет от 13.08.2007. Оpubл. 20.07.2009.

3. Патент РФ «Олеофильный биопрепарат, используемый для очистки нефтезагрязненной почвы». RU 2180276, МПК В 09С 1/10, С 12N 1/20, С 12N 1/26, С 12N 1/26, С 12R 1:01. Приоритет от 19.02.2001. Оpubл. 10.03.2002.

4. Паспорт штамма *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМВ-12342.

5. Справка №12342. Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика «О национальном патентном депонировании культуры *Tsukamurella tyrosinosolvens* PS2». Регистрационный номер ВКПМ: В-12342. Дата депонирования 17.06.15.

(57) Формула изобретения

Штамм бактерий *Tsukamurella tyrosinosolvens* ВКПМ В-12342 - деструктор алканов и продуцент биоПАВ, обладающий адгезией к углеводородам, применяемый для очистки почв, нефтешламов, пресноводных и морских акваторий от нефтяных загрязнений.