



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) A4 (11) 21710  
(51) C12N 1/20 (2006.01), C12N 1/26  
(2006.01), B09C 1/10// (C12N 1/20, C12R  
1:265, C12R 1:01, C12N 1:06) (2006.01)

КОМИТЕТ ПО ПРАВАМ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ИННОВАЦИОННОМУ ПАТЕНТУ

(21) 2008/0870.1

(22) 24.07.2008

(45) 15.09.2009, бюл. № 9

(72) Саданов Аманкелди Курбанович; Айткельдиева Светлана Айткельдиновна; Файзулина Эльмира Рамазановна; Ауэзова Ольга Николаевна; Курманбаев Аскар Абылайканович

(73) Дочернее государственное предприятие "Институт микробиологии и вирусологии" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Центр биологических исследований" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(56) Авторское свидетельство СССР № 1493666, C02F 3/34, 1989

(54) **КОНСОРЦИУМ ШТАММОВ MICROCCUS ROSEUS 34, RHODOCOCUS MARIS 65 И ARTHROBACTER GLOBIFORMIS 44A, ИСПОЛЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ**

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и экологии и может быть использовано для очистки почвенных экосистем от нефти и нефтепродуктов.

Задачей изобретения является получение нового консорциума микроорганизмов-деструкторов с высокой углеводородоксилирующей активностью, способного утилизировать нефть и нефтепродукты. В состав консорциума входят штаммы *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65 и *Arthrobacter globiformis* 44A, выделенные из почв с хроническим нефтяным загрязнением.

Предлагаемый консорциум активно утилизирует нефть и нефтепродукты. В модельных экспериментах снижает концентрацию нефти в почве при 5% загрязнении на 72,0% и при 10% загрязнении - на 64,2% за 3 месяца, что улучшает экологическую обстановку окружающей среды.

(19) KZ (13) A4 (11) 21710

Изобретение относится к области биотехнологии и экологии и может быть использовано для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов.

Известна биологически активная композиция для очистки поверхностных вод, почв и грунтов от нефтяных загрязнений (патент РФ 2270808, С02F, 2006). Консорциум содержит штаммы *Pseudoa-mycolata halophobica* ВСБ-753, *Kibdelosporangium aridum* ВСБ-754, *Acinetobacter oleovorum* ВСБ-712, *Rhodococcus erythropolis* НХ7 в объемном соотношении между собой 1:1:1:1.

Недостатком данной композиции микроорганизмов является неспособность осуществлять очистку почвы от нефти в условиях аридного климата с высокими температурами.

Известна смесь специально селекционированных штаммов бактерий *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ В-3078 (36а-1), *Rhodococcus luteus* ВКПМ В-3077 (25) и *Micrococcus flavus* ВКПМ В-3079 (53) (а.с. СССР № 1493666, С02F 3/34, 1989), используемая для деструкции нефти и нефтепродуктов.

Недостатком данной смеси микроорганизмов является использование указанных культур микроорганизмов только в аэротенках. Выращивание смеси культур возможно при больших материальных и энергозатратах.

Задачей изобретения является получение нового консорциума микроорганизмов-деструкторов с высокой углеводородокисляющей активностью, способного утилизировать нефть и нефтепродукты. В состав консорциума, входят штаммы *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65 и *Arthrobacter globiformis* 44А. Штаммы, входящие в консорциум выделены из почв с хроническим нефтяным загрязнением.

Штамм *Micrococcus roseus* 34 представляет собой кокки, одиночные, в парах и в скоплениях, 1,25-2,0 мкм. Грамположительные, неацетилвосприимчивые, спор не образуют. На МПА и РПА культура образует округлые, выпуклые колонии красного цвета, диаметром 1-2 мм. Край колоний ровный, пигментов в среду не выделяет.

Аэроб. При росте в МПБ происходит помутнение среды, выпадает осадок, на поверхности образуется кольцевидная пленка.

Штамм не токсичен и не патогенен.

Физиолого-биохимические признаки

В качестве источника углерода использует глюкозу, лактозу, маннозу.

Крахмал не гидролизует, желатину не разжижает. Сероводород и индол не образует. Нитраты восстанавливает до нитритов. Дает положительную реакцию на каталазу и оксидазу.

Культуру выращивают и хранят на косяках МПА или РПА. Температура хранения +4°C, пересев через 2 месяца.

Штамм характеризуется высокой способностью к утилизации нефти и нефтепродуктов.

Штамм бактерий *Micrococcus roseus* 34 депонирован в коллекции Института микробиологии и вирусологии МОН РК под номером ИМиВ В-67 и в Республиканской коллекции микроорганизмов НЦБ РК под номером В- RKM 0184.

Штамм *Rhodococcus maris* 65 представляет собой кокки, прорастающие в палочки. Клетки неподвижные. Грамположительные, кислотоустойчивые, спор не образуют. На МПА и РПА культура образует округлые, выпуклые колонии оранжевого цвета, диаметром 2-3 мм. Край колоний ровный, пигментов в среду не выделяет.

Аэроб. При росте в МПБ выпадает небольшой осадок, на поверхности образуется обильная сплошная пленка.

Штамм не токсичен и не патогенен.

Физиолого-биохимические признаки

В качестве источника углерода использует глюкозу, лактозу, а маннозу с образованием кислоты.

Крахмал не гидролизует, желатину не разжижает. Сероводород образует, индол не образует. Нитраты не восстанавливает. Дает положительную реакцию на каталазу и отрицательную на оксидазу.

Культуру выращивают и хранят на косяках МПА или РПА. Температура хранения +4°C пересев через 2 месяца.

Штамм характеризуется высокой способностью к утилизации нефтяных смесей и нефтепродуктов.

Штамм бактерий *Rhodococcus maris* 65 депонирован в коллекции ДПП «Института микробиологии и вирусологии» ЦБИ МОН РК под номером ИМиВ В-71 и в Республиканской коллекции микроорганизмов НЦБ РК под номером В-RKM 0185.

Штамм *Arthrobacter globiformis* 44-А представляет собой кокки, прорастающие в палочки. Клетки неподвижные. Грамположительные, неацетилвосприимчивые, спор не образуют. На МПА и РПА культура образует округлые, выпуклые колонии красного цвета, диаметром 2-3 мм. Край колоний ровный, пигментов в среду не выделяет.

Аэроб. При росте в МПБ наблюдается помутнение среды, выпадает осадок, на поверхности образуется кольцевидная пленка.

Штамм не токсичен и не патогенен.

Физиолого-биохимические признаки

В качестве источника углерода использует глюкозу, лактозу и маннозу.

Крахмал не гидролизует, желатину не разжижает. Сероводород и индол не образует. Нитраты восстанавливает до нитритов. Дает положительную реакцию на каталазу и отрицательную на оксидазу.

Культуру выращивают и хранят на косяках МПА или РПА. Температура хранения +4°C, пересев через 2 месяца.

Штамм характеризуется высокой способностью к утилизации нефти и нефтепродуктов.

Штамм бактерий *Arthrobacter globiformis* 44-А депонирован в коллекции Института микробиологии и вирусологии МОН РК под номером ИМиВ В-70 и в Республиканской коллекции микроорганизмов НЦБ РК под номером В-RKM 0187.

Консорциум состоит из суспензии клеток *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65 и *Arthrobacter globiformis* 44А, выращенных на среде РПА. Суспензию бактерий получают путем смыва с поверхности скошенной среды 5 мл стерильной среды ВД в соотношении 1:1:1.

Состав среды ВД, г/л дистиллированной воды:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2;  $\text{CaCl}_2$  - 0,02;  $\text{FeSO}_4$  - следы, pH среды 7,0-7,2.

Условия хранения консорциума и составляющих его штаммов.

Консорциум сохраняют на жидкой среде ВД с 1% нефти при 4°C и производят пересевы через 1 месяц, при этом культуры сохраняют высокую нефтеокисляющую активность.

В лабораторных условиях штаммы *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65 и *Arthrobacter globiformis* 44А поддерживаются на косяках с РПА и пересеваются через 1 месяц.

Сущность изобретения поясняется следующими конкретными примерами.

Пример 1. В сосуды вносят по 100г почвы, 10 г цеолита, азот и фосфор в виде  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , 5 и 10% нефти. Культуры активных нефтеокисляющих микроорганизмов выращивают на косяках РПА, затем стерильной средой ВД делают смывы в стерильную посуду. Полученную суспензию вносят по 25 мл в каждый сосуд с загрязненной почвой. Почву периодически взрыхляют и увлажняют.

Через 1 и 3 месяца проверяют утилизирующую способность, как консорциума, так и отдельных штаммов, входящих в него. С этой целью почвенные образцы экстрагируют гексаном и хлороформом. Количество остаточной нефти определяют гравиметрическим методом. Результаты представлены в таблице 1.

Через 1 месяц в контрольном варианте 1 в почве с 5% загрязнения естественная утилизация составила 26,6%, а при добавлении цеолита и удобрений

(контроль 2) - 31,7%. При внесении консорциума активных нефтеокисляющих микроорганизмов в почву содержание нефти снизилось на 53,5%.

Через 3 месяца количество утилизированной нефти в контрольных вариантах составило 36,4% и 44,6%, тогда как в опытных образцах - 72,0%.

При 10% загрязнении степень деградации нефти через месяц после внесения консорциума составила 48,3%, а через три месяца - 64,2%.

Пример 2. Утилизация нефтепродуктов консорциумом штаммов *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65 и *Arthrobacter globiformis* 44А.

Минеральную среду ВД разливают по 100 мл в колбы Эрленмейера объемом 750 мл и стерилизуют при 1 атм. 30 минут. Суспензию бактерий получают путем смыва с поверхности скошенной среды 5 мл стерильной воды в соотношении 1:1:1 и вносят в среду. В качестве единственного источника углерода добавляют дизельное топливо, керосин и бензин в количестве 3% по объему. Культивируют на качалке 220 об/мин при 28-30°C 7 суток. Накопление биомассы определяют с помощью ФЭК-56М при длине волны 540 нм. Контролем служит минеральная среда с нефтепродуктами без бактерий.

Полученные результаты (табл. 2) свидетельствуют о том, что предлагаемый консорциум способен активно потреблять дизельное топливо, керосин и бензин.

Таким образом, предлагаемый консорциумом штаммов *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65 и *Arthrobacter globiformis* 44А способен утилизировать нефть, а также бензин, керосин и дизельное топливо. Данный консорциум может быть использован для очистки нефтезагрязненных почв.

Таблица 1

Утилизация нефти отдельными штаммами и консорциумом микроорганизмов

Вариант	Кол-во внесенной нефти, г	Кол-во остаточной нефти, г	% утилизации нефти	Кол-во		% утилизации нефти
				внесенной нефти, г	остаточной нефти, г	
			через 1 месяц		через 3 месяца	
5% нефти						
<i>Micrococcus roseus</i> 34	5,0921	2,8414	44,2	5,1563	1,9955	61,3
<i>Rhodococcus maris</i> 65	5,1436	3,0553	40,6	5,0967	2,0132	60,5
<i>Arthrobacter globiformis</i> 44А	5,0174	2,9201	41,8	5,1262	1,9787	61,4
Консорциум	5,2668	2,4500	53,5	4,9196	1,3648	72,0
Контроль 1	5,0724	3,7240	26,6	4,9800	3,1673	36,4
Контроль 2	5,3100	3,5370	33,4	5,0478	2,7965	44,6
10% нефти						
<i>Micrococcus roseus</i> 34	10,1597	6,1263	39,7	10,2141	4,9641	51,4
<i>Rhodococcus maris</i> 65	10,1065	6,1751	38,9	10,1445	4,9911	50,8
<i>Arthrobacter globiformis</i> 44А	10,0856	6,0312	40,2	10,1186	4,8266	52,3
Консорциум	10,0749	5,2065	48,3	10,1857	3,6465	64,2
Контроль 1	10,4757	7,6585	26,9	10,7637	7,4308	31,8
Контроль 2	11,0134	7,5242	31,7	10,5931	6,6419	37,3

## Рост консорциума на нефтепродуктах

Вариант	Прирост биомассы, опт. ед.								
	дизельное топливо			керосин			бензин		
	исх.	3 сут.	7 сут.	исх.	3 сут.	7 сут.	исх.	3 сут.	7 сут.
консорциум	0,15	0,95	1,87	0,20	1,09	1,65	0,15	0,75	1,03
контроль	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Консорциум штаммов *Micrococcus roseus* 34 (депонирован в РКМ НЦБ РК, № В-РКМ 0184), *Rhodococcus maris* 65 (депонирован в РКМ НЦБ РК,

№ В-РКМ 0185) и *Arthrobacter globiformis* 44А (депонирован в РКМ НЦБ РК, № В-РКМ 0187), используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов.