



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010121688/10, 27.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
27.05.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.05.2010

(45) Опубликовано: 20.11.2011 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2378060 C2, 10.01.2010. RU 2143947 C1,  
10.01.2000. RU 2138451 C1, 27.09.1999. US  
3843517 A, 22.10.1974. SU 1730138 A1,  
30.04.1992.

Адрес для переписки:

300600, г.Тула, пр. Ленина, 92,  
Государственное образовательное  
учреждение высшего профессионального  
образования "Тульский государственный  
университет" (ТулГУ)

(72) Автор(ы):

Петриков Кирилл Владимирович (RU),  
Овчинникова Анастасия Алексеевна (RU),  
Ветрова Анна Андрияновна (RU),  
Пономарева Ольга Николаевна (RU),  
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),  
Пунтус Ирина Филипповна (RU),  
Самойленко Владимир Александрович (RU),  
Якшина Татьяна Васильевна (RU),  
Боронин Александр Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

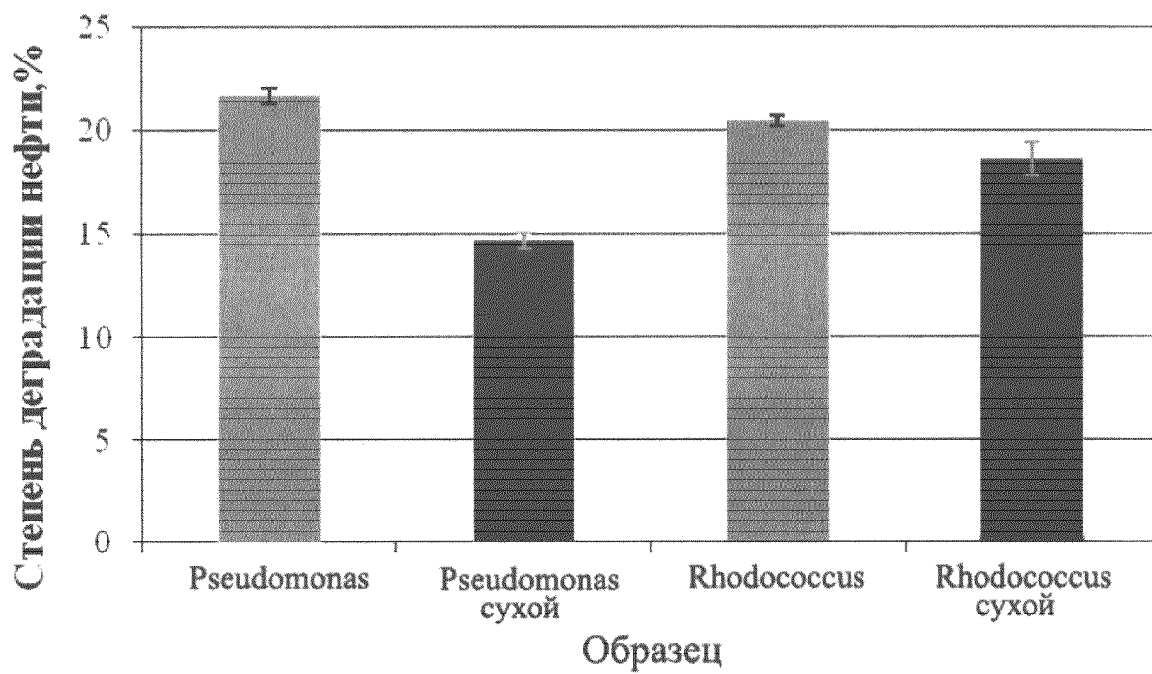
Государственное образовательное  
учреждение высшего профессионального  
образования "Тульский государственный  
университет" (ТулГУ) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОЧИСТКИ  
ТЕРРИТОРИЙ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Предложен способ получения сухой формы биопрепарата на основе микроорганизма-нефтедеструктора рода *Pseudomonas* или *Rhodococcus* для очистки территорий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. Культивируют бактерии рода *Pseudomonas* или *Rhodococcus* в жидкой питательной среде. Затем суспензию бактерий смешивают с защитной средой. При этом защитную среду готовят на основе 0,05 М натрий-калиевого фосфатного буфера pH 6,8

при следующем соотношении компонентов: 4% полиглюкина, 10% сахарозы, 4% тиомочевины, 2% аскорбиновой кислоты с последующим титрованием 45% раствором гидроксида натрия до pH 6,8-7,2. Полученную смесь добавляют к сорбенту - вспученному перлитовому песку. Затем проводят контактную сушку препарата при  $t=37^{\circ}\text{C}$  до постоянной массы. Способ позволяет повысить выживаемость бактериальных клеток микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* до 44% и 81% соответственно. 1 ил., 2 табл.



RU 2 4 3 4 0 5 9 C 1

RU 2 4 3 4 0 5 9 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 434 059** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

**C12N 1/26** (2006.01)

**C02F 3/34** (2006.01)

**B09C 1/10** (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010121688/10, 27.05.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**27.05.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **27.05.2010**

(45) Date of publication: **20.11.2011 Bull. 32**

Mail address:

**300600, g.Tula, pr. Lenina, 92, Gosudarstvennoe  
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
professional'nogo obrazovaniya "Tul'skij  
gosudarstvennyj universitet" (TulGU)**

(72) Inventor(s):

**Petrikov Kirill Vladimirovich (RU),  
Ovchinnikova Anastasija Alekseevna (RU),  
Vetrova Anna Andriyanovna (RU),  
Ponomareva Ol'ga Nikolaevna (RU),  
Filonov Andrej Evgen'evich (RU),  
Puntus Irina Filippovna (RU),  
Samojlenko Vladimir Aleksandrovich (RU),  
Jakshina Tat'jana Vasil'evna (RU),  
Boronin Aleksandr Mikhajlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie  
vysshego professional'nogo obrazovaniya  
"Tul'skij gosudarstvennyj universitet" (TulGU)  
(RU)**

## (54) METHOD OF OBTAINING DRY FORM OF BIOPREPARATION FOR CLEANING TERRITORIES FROM OIL CONTAMINANTS AND OIL PRODUCTS

(57) Abstract:

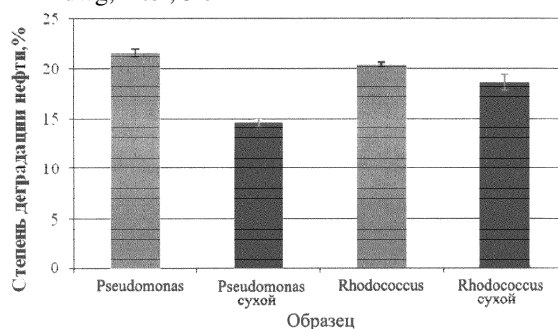
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: disclosed is a method of obtaining a dry form of a biopreparation based on *Pseudomonas* or *Rhodococcus* oil-decomposing microorganism for cleaning territories from oil and oil products. *Pseudomonas* or *Rhodococcus* bacteria are cultured in a liquid culture medium. The bacteria suspension is then mixed with a protective medium. The protective medium is prepared based on 0.05 M sodium-potassium phosphate buffer with pH 6.8, with the following ratio of components: 4% polyglucin, 10% saccharose, 4% thiourea, 2% ascorbic acid, followed by titration with 45% sodium hydroxide solution to pH 6.8-7.2. The obtained mixture is added to a sorbent - expanded perlite sand. The preparation

then undergoes contact drying at  $t=37^{\circ}\text{C}$  until constant mass.

EFFECT: method increases survival rate of bacterial cells of oil-decomposing microorganisms *Pseudomonas* and *Rhodococcus*.

1 dwg, 2 tbl, 3 ex



Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии, а именно технологии производства сухих микробных препаратов, предназначенных для очистки почв и водных поверхностей, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Известен способ контактной сушки микроорганизмов (2008589, Российская Федерация, F26B 5/16), предусматривающий смешивание суспензии микроорганизмов с сорбентом влаги, отличающийся тем, что перед смешиванием микроорганизмов с сорбентом последний и/или суспензию смешивают с гидрофобной жидкостью с возможным добавлением стабилизатора суспензии. Однако данный способ не используется для хранения нефтеокисляющих бактерий. К тому же отсутствует проверка выживаемости микроорганизмов в сухом препарате при хранении.

Известен способ получения сухой формы биопрепарата с последующим хранением (2160992, Российская Федерация, A23C 9/12), заключающийся в культивировании микроорганизмов в подобранных условиях с последующим сублимационным высушиванием полученного препарата с добавлением желатина, сахарозы и обезжиренного сухого молока в качестве защитных компонентов. При хранении при комнатной температуре в течение полугода снижение выживаемости было незначительным. Однако сублимационное высушивание требует значительных материальных затрат, а в процессе сушки из-за воздействия низких температур и вакуума может погибать значительная часть микроорганизмов. К тому же данный способ описан только для бактерий *Lactobacillus acidophilus*, и его использование для нефтеокисляющих бактерий может оказаться неэффективным.

Задачей настоящего изобретения является повышение выживаемости и сохранение деградативной активности клеток микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* при получении сухой формы биопрепарата из этих бактерий.

Для решения поставленной задачи сухую форму биопрепарата получают культивированием бактерий в жидкой питательной среде, введением защитной среды, смешиванием с сорбентом и контактной сушкой, при этом защитную среду готовят на основе 0,05 М натрий-калиевого фосфатного буфера (рН 6,8) при следующем соотношении компонентов: 4% полиглюкина, 10% сахарозы, 4% тиомочевины, 2% аскорбиновой кислоты с последующим титрованием 45% раствором гидроксида натрия до рН 6,8-7,2, в качестве сорбента используют вспученный перлитовый песок, а сушку проводят при  $t=37^{\circ}\text{C}$  до постоянной массы.

Таблица 1. Выживаемость микроорганизмов после контактной сушки, КОЕ/г и %.

Таблица 2. Выживаемость микроорганизмов при хранении при различных температурах, КОЕ/г и %.

Чертеж. Изменение концентрации нефти в процессе деградации относительно абиотического контроля в течение 10 суток при температуре  $24^{\circ}\text{C}$ .

Контактная сушка является распространенным способом подготовки биоматериалов к длительному хранению. В отличие от лиофильной сушки в этом методе микробные клетки не подвергаются воздействию низких температур, что позволяет существенно увеличить их выживаемость. Но, с другой стороны, сохраняется повреждающее воздействие на микроорганизмы за счет их обезвоживания. Таким образом, численность микроорганизмов после высушивания может быть существенно ниже, чем до сушки. Этот недостаток может быть устранен путем использования различных защитных сред: растворов, содержащих вещества, снижающие повреждающее действие обезвоживания. Теоретические основы механизма защиты клеток изучены слабо, поэтому поиск новых эффективных

защитных средств является областью практических исследований. В качестве компонентов защитной среды предлагается использовать следующие вещества: тиомочевину, сахарозу, полиглюкин и аскорбиновую кислоту. Данные вещества легко доступны, обладают низкой стоимостью, что является преимуществом описываемого способа.

Как сорбент-носитель для контактной сушки был выбран вспученный перлитовый песок (ГОСТ 10832-91). Его получают высокотемпературным обжигом водосодержащего вулканического стекла, называемого перлитом. Это легкий, инертный, негорючий, нетоксичный материал. Обладая высокой открытой пористостью (до 75%), перлитовый песок в течение 3-5 минут впитывает 10 г воды на 1 г сорбента. Одна из областей его применения - агропромышленность, где его применяют для улучшения структуры почв. Эти качества делают его удобным носителем для микроорганизмов при контактной сушке. Следует отметить его низкую стоимость, что является важным фактором для получения конкурентоспособного продукта с низкой себестоимостью.

В качестве биологической основы препарата используют штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов: *Pseudomonas* sp. ВКМ В-2387Д и *Rhodococcus* sp. ВКМ Ас-2532Д. Данные микроорганизмы входят в запатентованную ассоциацию микроорганизмов (2378090, Российская Федерация, МПК В09С 1/10; 2312891, Российская Федерация, МПК С12Н 1/20) и являются высокоэффективными нефтедеструкторами. Они обладают способностью утилизировать нефть при низких температурах (до 2°C) и в присутствии солей до 5%. Также эти штаммы являются продуцентами поверхностно-активных веществ, повышающих биодоступность гидрофобных субстратов, в число которых входит нефть и нефтепродукты. Использование в биопрепарате микроорганизмов, обладающих данными свойствами, делает его перспективным продуктом для применения в очистке территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Пример 1. Для приготовления сухой формы используется биомасса микроорганизмов-нефтедеструкторов *Pseudomonas* sp. ВКМ В-2387Д или *Rhodococcus* sp. ВКМ Ас-2532Д, полученная путем глубинного культивирования с последующим удалением культуральной жидкости центрифугированием. Биомасса должна иметь влажность 75-85% и численность живых клеток не менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г.

Готовится защитная среда на основе 0,05 М натрий-калиевого фосфатного буфера (рН 6,8), содержащая 4% полиглюкина, 10% сахарозы, 4% тиомочевины, 2% аскорбиновой кислоты. Кислотность среды доводят до уровня рН 6,8-7,2 титрованием 45% раствором гидроксида натрия. Суспензию смешивают с защитной средой в пропорции 1:1 по массе. Полученную смесь медленно добавляют в емкость, содержащую сорбент (вспученный перлитовый песок), обеспечивая равномерное распределение раствора по объему сорбента интенсивным перемешиванием. Сорбент берут исходя из расчета: на 1 г смеси суспензии с защитной средой необходимо 0,25 г сорбента. Готовую смесь наносят тонким слоем (2-3 мм) на ровную, гладкую стерильную поверхность, не допускающую прилипания (стеклянная пластина). Препарат высушивают при 37°C до постоянной массы.

Для оценки количества микроорганизмов, сохранивших жизнеспособность при сушке, рассчитывают выживаемость бактериальных клеток - процентное отношение концентрации клеток в готовом препарате сразу после окончания высушивания (КОЕ2) к их концентрации в исходной биомассе (КОЕ1). Для учета изменения массы образцов при высушивании при расчете выживаемости число КОЕ2 умножают на

коэффициент, равный отношению массы готового препарата ( $m_2$ ) к массе исходной суспензии ( $m_1$ ). Выживаемость рассчитывают по конечной формуле:  $V = [KOE_2 \times m_2 / (KOE_1 \times m_1)] \times 100\%$ .

Концентрацию живых клеток - число колониеобразующих единиц (КОЕ) - определяют стандартным методом серийных десятикратных разведений с последующим высевом на агаризованную питательную среду Лурия-Бетани. Число колоний подсчитывают через 2 дня.

Выживаемость микроорганизмов составила 25-44% для *Pseudomonas* sp. и 75-81% для *Rhodococcus* sp. (табл.1). Данный показатель является высоким для клеток неспорообразующих бактерий, к которым относятся использованные штаммы.

Пример 2. Сухой биопрепарат, полученный, как описано в примере 1, помещают в полиэтиленовые мешки и запаивают. Хранение осуществляют при комнатной температуре, в холодильнике при температуре 2-4°C или в морозильной камере при -20°C.

Через 6 месяцев при хранении в морозильной камере концентрация живых клеток составила 24% и 20% для *Pseudomonas* sp. и *Rhodococcus* sp. соответственно (табл.2). Данные показатели высоки, что говорит об оптимальном составе защитной среды, использованной в работе.

После вскрытия пакета биопрепарат рекомендуется использовать в течение нескольких дней и не помещать на хранение вторично.

Пример 3. Для оценки эффективности биопрепарата проводили лабораторный модельный эксперимент по нефтеструкции. Для этого навеску сухого препарата (1 г), полученного, как описано в примере 1, хранящегося в течение двух недель при температуре -20°C, помещали в 10 мл физиологического раствора. Перемешивали в течение 20 минут для регидратации клеток бактерий. В колбы Эрленмейера объемом 750 мл вносили 100 мл минеральной питательной среды Эванса для культивирования микроорганизмов. В каждую колбу добавляли 1,73 г сырой нефти и 1 мл рабочего раствора биопрепарата (концентрация микроорганизмов  $10^7$ - $10^8$  КОЕ/мл). Для сравнения деградативной активности биопрепарата и свежей культуры проводили культивирование микроорганизмов на богатой среде Лурия-Бетани. Вместо биопрепарата в колбы с нефтью инокулировали 10 мл суспензии свежес выращенных микроорганизмов (концентрация  $10^8$  КОЕ/мл). В качестве нулевого контроля использовали колбы с нефтью без внесения биоматериала.

Нефтедеградирующую активность исследованных штаммов оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде, определяемому методом ИК-спектрометрии. Анализ данных (см. чертеж) по изменению остаточной концентрации нефти показал, что наблюдается снижение деградации нефти на 5% и 2% в системах, обработанных сухими препаратами *Pseudomonas* и *Rhodococcus* соответственно, что является незначительным и свидетельствует о правильно выбранных условиях высушивания и хранения препаратов.

Таким образом, разработан эффективный способ получения сухой формы нефтеокисляющих микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, позволяющий повысить выживаемость бактериальных клеток до 44% и 81% соответственно и сохранить высокий уровень деградативной активности (15% и 18% соответственно).

Таблица 1				
Номер образца	Штамм			
	<i>Pseudomonas</i> sp. BKM B-2387Д		<i>Rhodococcus</i> sp. AC-2532Д	
0 (до сушки)	$(1,9 \pm 0,6) \times 10^{10}$	100%	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{11}$	100%

1	$(4,7 \pm 2,0) \times 10^9$	24,7%	$(9,0 \pm 3,0) \times 10^{10}$	75,0%
2	$(6,2 \pm 3,2) \times 10^9$	32,6%	$(7,2 \pm 2,7) \times 10^{10}$	60,0%
3	$(8,3 \pm 3,8) \times 10^9$	43,7%	$(9,7 \pm 2,0) \times 10^{10}$	80,8%

5

10

15

Таблица 2					
		Штамм			
Время хранения, мес	Температура хранения, °С	Pseudomonas sp. ВКМ В-2387Д		Rhodococcus sp. Ас-2532Д	
0	-	$5,0 \times 10^8$	100%	$6,2 \times 10^{10}$	100%
1 месяц	комнатная	$6,5 \times 10^7$	13%	$9,1 \times 10^9$	15%
	2-4	$1,2 \times 10^8$	24%	$2,5 \times 10^{10}$	42%
	-20	$1,6 \times 10^8$	32%	$1,3 \times 10^{10}$	22%
2 месяца	комнатная	$3,0 \times 10^7$	6%	$1,0 \times 10^8$	0,2%
	2-4	$1,2 \times 10^8$	24%	$6,5 \times 10^9$	11%
	-20	$1,2 \times 10^8$	24%	$1,3 \times 10^{10}$	22%
6 месяцев	комнатная	$1,0 \times 10^6$	0,2%	$4,1 \times 10^7$	0,1%
	2-4	$1,5 \times 10^7$	3%	$1,9 \times 10^9$	3,2%
	-20	$1,2 \times 10^8$	24%	$1,2 \times 10^{10}$	20%

20

### Формула изобретения

25

30

Способ получения сухой формы биопрепарата на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* или *Rhodococcus* для очистки территорий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, включающий культивирование бактерий в жидкой питательной среде, введение защитной среды, смешивание с сорбентом и контактную сушку, отличающийся тем, что защитную среду готовят на основе 0,05 М натрий-калиевого фосфатного буфера (рН 6,8) при следующем соотношении компонентов: 4% полиглюкина, 10% сахарозы, 4% тиомочевины, 2% аскорбиновой кислоты с последующим титрованием 45%-ным раствором гидроксида натрия до рН 6,8-7,2, в качестве сорбента используют вспученный перлитовый песок, а контактную сушку проводят при  $t=37^\circ\text{C}$  до постоянной массы.

35

40

45

50