



(51) МПК

B09C 1/10 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C02F 101/34 (2006.01)

C02F 103/34 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

B09C 1/10 (2023.05); C02F 3/34 (2023.05); C12N 1/20 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2023113206, 22.05.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.05.2023Дата регистрации:
18.09.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.05.2023

(45) Опубликовано: 18.09.2023 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15, ПГНИУ
(УНИД), Пьянков Сергей Васильевич

(72) Автор(ы):

Егорова Дарья Олеговна (RU),
Плотникова Елена Генриховна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Пермский государственный
национальный исследовательский
университет" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2262531 C2, 20.10.2005. RU
2777111 C9, 10.11.2022. RU 2484131 C2,
10.06.2013. RU 2585537 C1, 27.05.2016. CN
115322926 A, 11.11.2022. WO 2016036748 A1,
10.03.2016. ВОРОНИНА А. О. "Разнообразие
и молекулярно-биологическая характеристика
бактерий-деструкторов бифенила
(хлорированных бифенилов) техногенных
экосистем", на правах рукописи, г. Пермь,
(см. прод.)(54) Способ биodeградации гидроксированных бензойных кислот с использованием штамма *Rhodococcus ruber* P25

(57) Реферат:

Изобретение относится к области микробиологии и биотехнологии, в частности к разрушению гидроксированных бензойных кислот с помощью микроорганизмов. Способ биodeградации гидроксibenзойных кислот предусматривает взаимодействие 4-гидроксibenзойной, 3,4-дигидроксibenзойной, 2,5-дигидроксibenзойной кислот в концентрации 1000 мг/л с клетками штамма *Rhodococcus ruber*

P25 (ИЭГМ 896) в жидкой минеральной среде без дополнительных источников углерода. Предлагаемый способ обеспечивает биodeградацию моно- и дигидроксированных бензойных кислот высокой концентрации, образующихся как продукт разложения внутриклеточных соединений и стойких органических загрязнителей до безопасных соединений. 5 пр.

(56) (продолжение):
2020.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

B09C 1/10 (2006.01)*C02F 3/34* (2006.01)*C02F 101/34* (2006.01)*C02F 103/34* (2006.01)*C12N 1/20* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

B09C 1/10 (2023.05); *C02F 3/34* (2023.05); *C12N 1/20* (2023.05)(21)(22) Application: **2023113206, 22.05.2023**(24) Effective date for property rights:
22.05.2023Registration date:
18.09.2023

Priority:

(22) Date of filing: **22.05.2023**(45) Date of publication: **18.09.2023** Bull. № 26

Mail address:

**614990, g. Perm, ul. Bukireva, 15, PGNIU (UNID),
Pyankov Sergej Vasilevich**

(72) Inventor(s):

**Egorova Daria Olegovna (RU),
Plotnikova Elena Genrikhovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «Permskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet» (RU)**(54) **METHOD FOR BIODEGRADATION OF HYDROXYLATED BENZOIC ACIDS USING RHODOCOCCUS RUBER P25 STRAIN**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology; biotechnology.

SUBSTANCE: destruction of hydroxylated benzoic acids by microorganisms. The method for biodegradation of hydroxybenzoic acids involves the interaction of 4-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxybenzoic, 2,5-dihydroxybenzoic acids at a concentration of 1000 mg/l with cells of the *Rhodococcus ruber* P25 strain (IEGM 896) in a liquid mineral medium without

additional carbon sources.

EFFECT: biodegradation of mono- and dihydroxylated benzoic acids of high concentration, formed as a product of the decomposition of intracellular compounds and persistent organic pollutants to safe compounds.

1 cl, 5 ex

Изобретение относится к области микробиологии и биотехнологии, в частности к разрушению гидроксированных бензойных кислот с помощью микроорганизмов.

Гидроксibenзойные кислоты, а именно 4-гидроксibenзойная кислота, 3,4-дигидроксibenзойная кислота и 2,5-дигидроксibenзойная кислота являются продуктами разложения ароматических и гидроксiarоматических соединений, в том числе синтетических стойких органических загрязнителей, бактериями, растениями и грибами [Gibson F., Pittard J. Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in microorganisms // Bacteriol. Rev. 1968ю Vol. 32. P. 465-492]. 3,4-гидроксibenзойная и 2,5-дигидроксibenзойная кислоты используются в косметологической и фармацевтической промышленности, в следствии чего являются загрязнителями окружающей среды антропогенного происхождения [Cha J.W., Piao M.J., Kim K.C., Zheng J., Yao C.W., Hyun C.L., Kang H.K., Yoo E.S., Koh Y.S., Lee N.H., Ko M.H., Hyun J.W. Protective effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid isolated from *Cladophora wrightiana* Harvey against ultraviolet B radiation-induced cell damage in human HaCaT keratinocytes // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. Vol. 172. P. 582-592; Патент EP 1945614 A1 Process for preparation of chiral amlodipine gentisate; Soni M.G., Carabin I.G., Burdock G.A. Safety assessment of esters of phydroxybenzoic acid (parabens) // Food Chem. Toxicol. 2005. Vol. 43. P. 985-1015; Bais H.P., Vepachedu R., Vivanco J.M. Root specific elicitation and exudation of fluorescent beta-carbolines in transformed root cultures of *Oxalis tuberosa* // Plant Physiol. Biochem. 2003. Vol. 41. P. 345-353]. Также следует отметить, что 4-гидроксibenзойная кислота выступает как токсин для растений, животных и человека [паспорт безопасности в соотв. ГОСТ 30333-2007 <https://www.carlroth.com>]. Таким образом, накопление гидроксibenзойных кислот как природного так и антропогенного происхождения в окружающей среде оказывает негативное воздействие на компоненты экосистемы.

Для решения проблемы очистки природных компонентов от гидроксibenзойных кислот предпочтение отдается технологиям, основанным на использовании метаболического потенциала природных микроорганизмов, в частности аэробных бактерий. Среди описанных биодеструкторов гидроксibenзойных кислот есть представители бактериальных родов *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* [Solyanikova I.P., Emelyanova E.V., Shumkova E.S., Egorova D.O., Korsakova E.S., Plotnikova E.G., Golovleva L.A. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2015. – V.100. – 155–164. Егорова Д. О., Корсакова Е. С., Демаков В.А., Плотникова Е. Г. Деструкция ароматических углеводов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Том 49, № 3. – С. 267–278; Solyanikova I.P., Travkin V.M., Rybkina D.O., Plotnikova E.G., Golovleva L.A. Varyability of enzyme system of *Nocardioform* bacteria as a basis of their metabolic activity // J. Environmental Science and Health. Part B. 2008. V.43. p. 241-252; патент CN115322926 (A) – 2022-11-11 *Rhodococcus* pyridines and application thereof in remediation of continuous cropping soil; патент CN113444660 (A) – 2021-09-28 *Bacillus amyloliquefaciens* strain LXBA.1 and application thereof; патент CN113652375 (A) – 2021-11-16 *Alcaligenes* family aerobic new bacterium T-4 and application thereof; патент CN106698678 (A) – 2017-05-24 Application of *Bacillus* in degrading aromatic compounds; патент CN108753641 (a) – 2018-11-06 Germ capable of efficiently degrading autotoxin p-hydroxybenzoic acid and application of germ; патент CN111575216 (A) – 2020-08-25 *Pseudomonas putida* capable of degrading phenolic acid autotoxins and application of *pseudomonas putida*; патент CN110408567 (A) – 2019-11-05 Saline-alkaline tolerant *bacillus methylophilus*, and live bacterial preparation and application thereof]. Для большинства

известных штаммов описана способность использовать гидроксibenзойные кислоты как источник углерода для роста бактериальных культур, однако нет сведений с какой скоростью и при каких начальных концентрациях происходит деструкция гидроксibenзойных кислот, а также возможна ли одновременная деградация трех, наиболее часто встречающихся, гидроксibenзойных кислот известными штаммами бактерий. Кроме того, представителя ряда описанных родов бактерий-деструкторов гидроксibenзойных кислот обладают патогенными свойствами в отношении человека и животных. В связи с этим актуален поиск новых непатогенных микроорганизмов, проявляющих высокую деструктивную активность к гидроксibenзойным кислотам.

Штамм *Rhodococcus ruber* P25 (ИЭГМ 896) известен как активный деструктор хлорированных бифенилов [Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Демаков В.А. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – деструктор полихлорированных бифенилов. Патент RU 2262531 C2. 2005. Бюл. №29; Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., Kir'yanova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. – 2020. – V. 400. – Article 123328; Gorbunova T.I., Egorova D.O., Pervova M.G., Kyrianova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their hydroxylated derivatives by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – V. 409. – Article 124471; Егорова Д. О., Горбунова Т. И., Кирьянова Т. Д., Первова М. Г., Плотникова Е. Г. Моделирование структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов рода *Rhodococcus* и особенности их деградативной активности к хлорированным- и гидроксированным бифенилам при различных температурах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57, № 6. – С. 571–582; Плотникова Е.Г., Соляникова И.П., Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Головлева Л.А. Особенности разложение 4-хлорбифенила и 4-хлорбензойной кислоты штаммом *Rhodococcus ruber* P25 // Микробиология. – 2012. – Т. 81, №2. – С.159–170.], запрещенных к применению в связи с ограничениями, наложенными Стокгольмской конвенцией на соединения группы СОЗ (стойких органических загрязнителей). Показано, что данный штамм проявляет деградативную активность и к гидроксированным бензойным кислотам. Штамм не обладает патогенными свойствами, характеризуется набором ферментов, проявляющих активность к широкому спектру ароматических соединений, что делает его перспективным для разработки основы биопрепарата, направленного на разложение гидроксibenзойных кислот.

Цель настоящего изобретения – разработка способа эффективной биодеструкции гидроксibenзойных кислот (4-гидроксibenзойной, 3,4-дигидроксibenзойной, 2,5-дигидроксibenзойной кислот) в относительно высокой концентрации (1000 мг/л) с использованием бактериального штамма *Rhodococcus ruber* P25 (ИЭГМ 896).

Техническим результатом описываемого изобретения является обеспечение полной биодеструкции гидроксibenзойных кислот (4-гидроксibenзойной, 3,4-дигидроксibenзойной, 2,5-дигидроксibenзойной кислот) с помощью штамма рода *Rhodococcus* на основе разработанной технологии и подобранных оптимальных условий осуществления процесса биodeградации, при этом концентрация гидроксibenзойных кислот 1000мг/л и температура культивирования +28°C являются предпочтительными.

Данный технический результат достигается посредством реализации способа биodeградации гидроксibenзойных кислот, который предусматривает взаимодействие гидроксibenзойных кислот с клетками *Rhodococcus ruber* P25 (ИЭГМ 896). Процесс осуществляют в минеральной среде, содержащей источники азота, фосфора и минеральные соли. Применение заявленного способа обеспечивает полную

биodeградация 1000мг/л гидроксибензойных кислот, присутствующих в среде как индивидуально, так и в смеси, клетками *Rhodococcus ruber* P25 (ИЭГМ 896) за 5-7 суток.

В способе используется штамм *Rhodococcus ruber* P25 (ИЭГМ 896) деструктор полихлорированных бифенилов (патент RU2262531 C2), представленный в Региональной специализированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации культур 768, www.iegmc.ru).

Изобретение осуществляется следующим образом.

Периодическое культивирование *Rhodococcus ruber* P25 (ИЭГМ 896) осуществляют в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл при объеме минеральной среды 100 мл в условиях постоянного перемешивания (140 об/мин) при 28°C или 32°C. Для культивирования используют минеральную среду К1 следующего состава (г/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 4.0, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ – 0.4, $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5, $Ca(NO_3)_2$ – 1.0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.15, $NaMoO_4 \times 2H_2O$ – 0.04, pH среды 7.3 [Tsoi, T.V. Cloning and expression of the *Arthrobacter globiformis* KZT1 *fcba* gene encoding dehalogenase (4-chlorobenzoate-4-hydroxylase) in *Escherichia coli* / T.V. Tsoi [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1991. – V. 81. – P. 165–170]. Бактерии, выращенные на агаризованной минеральной среде К1 (для создания плотной среды вносили агар в концентрации 1,5%) с внесением в качестве источника углерода бензойной кислоты в концентрации 0,5 г/л в течение 72 часов, суспендированные в физиологическом растворе, вносят в среду культивирования до конечной концентрации 1.0×10^4 клеток/мл. Гидроксибензойные кислоты (4-гидроксибензойной, 3,4-дигидроксибензойной, 2,5-дигидроксибензойной кислот) (99,5%, «Sigma-Aldrich», США) вносят индивидуально или в смеси в концентрации 1000мг/л в виде водного раствора, при необходимости уравновешенного гидроксидом натрия до нейтрального значения pH (pH 7.0). В качестве контроля используют стерильный раствор гидроксибензойных кислот в минеральной среде К1 для оценки абиотической деградации. Продолжительность процесса биодеструкции гидроксибензойных кислот составляет 5-7 сут. Оптическую плотность (ОП) суспензии клеток определяют с помощью спектрофотометра Bio-Spec-mini («Shimadzu», Япония) при длине волны 600 нм, длине оптического пути кварцевой кюветы 1,0 см, объем кюветы 4 мл. Для обнаружения остаточных гидроксибензойных кислот и их возможных метаболитов культуральную жидкость очищали от бактериальных клеток центрифугированием (9660 g в течение 10 мин на центрифуге 3K30 «Sigma Sartorius», Германия) и анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20AD Prominence («Shimadzu», Япония) с колонкой C-18 (150x4,6 мм, «Sigma-Aldrich», США) и УФ-детектором SPD-20A («Shimadzu», Япония) при длине волны 205 нм. В качестве элюента используют систему ацетонитрил–0,1%-ная H_3PO_4 (60:40). Качественное определение гидроксибензойных кислот и их возможных метаболитов проводят по сравнению времени удержания на колонке исследуемых соединений и стандартных соединений (4-гидроксибензойной, 3,4-дигидроксибензойной, 2,5-дигидроксибензойной кислот, катехол в виде водных растворов в концентрации 100 мг/л). Количественное определение гидроксибензойных кислот проводят по сравнению площади пиков на хроматограмме исследуемых и стандартных соединений (4-гидроксибензойной, 3,4-дигидроксибензойной, 2,5-дигидроксибензойной кислот в виде водных растворов в концентрации 100 мг/л).

Изобретение поясняется следующими примерами.

Пример 1.

Биodeградацию 4-гидроксибензойной кислоты проводят с использованием клеток *R. ruber* P25 (ИЭГМ 896) в 100 мл минеральной среды, содержащей источники азота,

фосфора и минеральные соли при постоянном перемешивании (140 об/мин) и при 28°C. 4-гидроксibenзойную кислоту(1000 мг/л) вносят одновременно с инокулятом в виде водного раствора с рН 7.0. Количество остаточной 4-гидроксibenзойной кислоты контролируют методом ВЭЖХ. Полная биodeградация 4-гидроксibenзойной кислоты в концентрации 1000 мг/л регистрируется через 5 сут, после внесения кислоты.

Пример 2.

Способ осуществляется по примеру 1, но вносят 3,4-дигидроксibenзойную кислоту в концентрации 1000 мг/л. Полная биodeградация 3,4-дигидроксibenзойной кислоты регистрируется на 5 сут после внесения кислоты.

Пример 3.

Способ осуществляется по примеру 1, но вносят 2,5-дигидроксibenзойную кислоту в концентрации 1000 мг/л. Полная биodeградация 2,5-дигидроксibenзойной кислоты регистрируется на 6 сут после внесения кислоты.

Пример 4.

Способ осуществляется по примеру 1, но вносят смесь 4-гидроксibenзойной, 3,4-дигидроксibenзойной, 2,5-дигидроксibenзойной кислот в концентрации 1000 мг/л. Полная биodeградация смеси кислот наступает через 6 сут после внесения данной смеси.

Пример 5.

Способ осуществляется по примеру 4, но культивирование проводят при 32°C.

Полная биodeградация смеси гидроксibenзойных кислот регистрируется через 7 сут после внесения данной смеси кислот.

(57) Формула изобретения

Способ биodeградации гидроксibenзойных кислот, предусматривающий взаимодействие 4-гидроксibenзойной, 3,4-дигидроксibenзойной, 2,5-дигидроксibenзойной кислот в концентрации 1000 мг/л с клетками штамма *Rhodococcus ruber* P25 (ИЭГМ 896) в жидкой минеральной среде без дополнительных источников углерода.