



(51) МПК

*C12N* 1/20 (2006.01)*C02F* 3/34 (2006.01)*C12N* 1/26 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013130141/10, 01.07.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
01.07.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.07.2013

(45) Опубликовано: 20.08.2014 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2465216 C1, 27.10.2012. RU  
2465217 C1, 27.10.2012. RU 2322400 C1,  
20.04.2008

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28,  
Институт биологии Коми научного центра УрО  
РАН, Патентно-информационная группа

(72) Автор(ы):

Маркарова Мария Юрьевна (RU),  
Щемелинина Татьяна Николаевна (RU),  
Анчугова Елена Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биологии Коми  
научного центра Уральского отделения  
Российской академии наук (RU)

(54) ШТАММ *RHODOTORULA SP.* ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ, ВОД, СТОЧНЫХ ВОД, ШЛАМОВ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для очистки почв, вод, сточных вод, шламов от нефти и нефтепродуктов. Штамм *Rhodotorula sp.* 51-18-2P депонирован во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина

РАН под регистрационным номером ВКМ У-2993D. Штамм способен разрушать нефть и нефтепродукты в загрязненной воде или почве. Изобретение позволяет повысить эффективность очистки почв, вод, сточных вод и шламов от нефти и нефтепродуктов. 3 табл., 2 пр.

RU 2 526 496 C 1

RU 2 526 496 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C12N* 1/20 (2006.01)*C02F* 3/34 (2006.01)*C12N* 1/26 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013130141/10, 01.07.2013

(24) Effective date for property rights:  
01.07.2013

Priority:

(22) Date of filing: 01.07.2013

(45) Date of publication: 20.08.2014 Bull. № 23

Mail address:

167982, g.Sykytyvkar, ul. Kommunisticheskaja, 28,  
Institut biologii Komi nauchnogo tsentra UrO RAN,  
Patentno-informatsionnaja grupp

(72) Inventor(s):

Markarova Marija Jur'evna (RU),  
Shchemelinina Tat'jana Nikolaevna (RU),  
Anchugova Elena Mikhajlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoju bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Institut biologii Komi  
nauchnogo tsentra Ural'skogo otdelenija  
Rossijskoj akademii nauk (RU)

(54) **STRAIN RHODOTORULA SP FOR CLEANING SOIL, WATER, WASTE WATER, SLUDGE FROM CRUDE OIL AND PETROLEUM PRODUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: strain Rhodotorula sp. 51-18-2P is deposited in the Russian National Collection of Microorganisms of the Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms n.a. GK Scriabin of RAS under the registration number RNCM Y-2993D. The

strain is capable to destroy crude oil and petroleum products in contaminated water or soil.

EFFECT: invention enables to improve the efficiency of cleaning of soil, water, waste water and sludge from crude oil and petroleum products.

3 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области биотехнологии и касается получения нового штамма бактерий, эффективного для очистки нефтезагрязненных почв, водоемов, сточных вод загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Известны штаммы *Micobacterium flavescens* ВКПМ - В-6000, *Micobacterium* sp. ИЖ-4, *Rhodococcus* sp. 56д, *Acinetobacter* sp. НВ-1 (Патент РФ №2191752, опубликовано 27.10.2002 г., приоритет 27.09.1999 г.; Патент РФ №2191753, опубликовано 27.10.2002 г., приоритет 27.09.1999 г.). Недостатком этих культур является узкий диапазон рН среды (6,8-8,0).

Известны штаммы *Mycobacterium phlei* и *Pseudomonas aeruginosa* (Патент РФ №2053206, опубликовано 27.01.1996 г., приоритет 29.09.1994 г.), применяемые для биодеструкции углеводородов нефтепродуктов в окружающей среде в теплое время года. Однако эти штаммы неэффективны в воде ниже 12°C. Кроме того, вид *Pseudomonas aeruginosa* относится к условно-патогенным микроорганизмам и использование в открытых системах недопустимо.

Задачей изобретения является получение нового штамма бактерии, обеспечивающего разрушение растворенных в воде нефтепродуктов загрязненных водоемов и сточных вод, а также нефти и нефтепродуктов в загрязненной почве.

Штамм *Rhodotorula* sp. 51-18-2 (номер, присвоенный штамму авторами) выделен в 2001 году из пробы почвы Усинского района Республики Коми, изъятой в подфакельной зоне после завершения эксплуатации объекта. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов, номер VKM Y-2993D.

В классификации микроорганизмов по группам патогенности Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 от 1 мая 2008 г. «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» данный вид (род) не значится.

Описание условий, необходимых для культивирования штамма: среда для культивирования следующего состава: на 1000 мл воды - сахароза 20 г, NaNO<sub>3</sub> - 3,0 г; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,0 г; KCl - 0,5 г; MgSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0,5 г; Алканы - 10 г, 15-25°C, 3-5 суток в условиях жидкофазной ферментации.

Штамм характеризуется следующими признаками: Колонии ярко-розовые, выпуклые, гладкие, блестящие слизистые, край ровный. Клетки овальные, крупные, 3-7 X 4-15 мкм, почкование полярное.

Режим хранения штамма - длительное хранение в лиофилизированной форме в плотно запаянных стеклянных ампулах. Кратковременное хранение (для подготовки биомассы с целевым использованием) - периодические пересевы - 1 раз в 2 месяца с хранением выросшей чистой культуры на скошенном агаре среды следующего состава: на 1000 мл воды - сахароза 30 г, NaNO<sub>3</sub> - 3,0 г; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,0 г; KCl - 0,5 г; MgSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0,5 г; агар микробиологический - 20,0; в закрытых пробирках в холодильнике при температуре не выше +6 и не ниже +1°C.

Способность штамма к биодеструкции нефти и нефтепродуктов изучали в лабораторных опытах со сточной водой и почвенными пробами загрязненных нефтью, результаты приведены в примерах ниже.

Пример 1. Разрушение углеводородов в воде

Для изучения углеводородоокисляющих свойств штамма был проведен опыт в присутствии сырой нефти. На 1 л воды добавляли NaNO<sub>3</sub> - 2,0 г; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,0 г; KCl - 0,5 г; MgSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0,5 г, раствор разливали в 250 мл колбы по 100 мл стерилизовали

их в течение часа в автоклаве, охлаждали до комнатной температуры, затем до температуры экспозиции в холодильнике, после чего проводили заражение содержимого колбы предварительно приготовленной суспензией живой культуры *Rhodotorula sp. 51-18-2 P-Y-2993D* с титром живых клеток 10 млрд. клеток/1 мл в количестве 1 мл на колбу. Контрольную колбу микроорганизмами не заражали. Во все колбы добавляли по 0,5 г сырой нефти. Условия опыта - температура 0+2°C, +25°C (таблица 1). Длительность 10 суток.

Обозначение вариантов опыта		
Варианты опыта	1. t +2°C	2. t +25°C
1. Контроль	1-1	1-2
2. <i>Rhodotorula sp. 51-18-2 P-Y-2993D</i>	2-1	2-2

Содержание нефти в почве анализировали методом флуориметрии на анализаторе жидкости «Флюорат-02» в соответствии с ПНД Ф 16.1.21-98 [Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости «Флюорат-02». ПНД Ф 16.1.21-98. - М., 1998. - 15 с.]. Результаты анализа концентрации углеводов приведены в таблице 2. Как видно из данных анализа, в присутствии штамма *Rhodotorula sp. 51-18-2 P-Y-2993D* происходит снижение концентрации растворенных в воде углеводов, усиливающееся при повышении температуры от +2 до +25°C от 56 до 91%.

Изменение концентрации растворенных в воде углеводов в опыте			
Вариант	Температура, °C	Концентрация растворенных углеводов, мг/дм <sup>3</sup>	Общая степень деструкции, %
1-1	2	13,0	0
1-2	25	24	0
2-1	2	5,7	56
2-2	25	2,2	91

#### Пример 2. Разрушение углеводов в почве.

Для опыта брали почву (песок), загрязняли ее нефтью в количестве 150 мг/г. В почвенные пробы вносили суспензию штамма *Rhodotorula sp. 51-18-2 P-Y-2993D* с титром клеток 10<sup>10</sup> в количестве мл на 1 кг пробы. Условия опыта - температура 25°C и 5°C в течение 15 суток. Содержание нефти в почве анализировали методом флуориметрии на анализаторе жидкости «Флюорат-02» в соответствии с ПНД Ф 16.1.21-98 [Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости «Флюорат-02». ПНД Ф 16.1.21 - 98. - М., 1998. - 15 с.]. Результаты приведены в таблице 3.

Как видно из представленных в таблице результатов - в сравнении с контролем, в почвенных пробах произошло снижение концентрации нефти в течение опыта как при комнатной температуре, так и в более холодных условиях. Таким образом, штамм *Rhodotorula sp. 51-18-2 P-Y-2993D* можно использовать для очистки нефтезагрязненных почв и водоемов как в нормальных условиях, так и в условиях холодного климата.

Изменение уровня нефтяного загрязнения в опыте		
Варианты опыта	Длительность экспозиции, суток	Концентрация нефтепродуктов в пробах почвы, мг/дм <sup>3</sup>
Контроль	15, температура 25°C	55,0
Контроль	15, температура +5°C	78,0
<i>Rhodotorula sp. 51-18-2 P-Y-2993D</i>	15, температура 25°C	14,9

Rhodotorula sp. 51-18-2 P-Y-2993D	15, температура 5°C	30,7
-----------------------------------	---------------------	------

## Формула изобретения

Штамм *Rhodotorula* sp. ВКМ Y-2993D, используемый для очистки почв, вод, сточных  
5 вод, шламов от нефти и нефтепродуктов.

10

15

20

25

30

35

40

45