



(51) МПК
C02F 3/34 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/265 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014126253/10, 27.06.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 27.06.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.06.2014

(45) Опубликовано: 27.10.2015 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2122980 C1, 10.12.1998. KZ 23150 A4, 15.11.2010. PAINTER H.A. "A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganism", Water Res., 1970, no.4, pp.393-450

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Щемелинина Татьяна Николаевна (RU),
 Анчугова Елена Михайловна (RU),
 Маркарова Мария Юрьевна (RU),
 Володин Владимир Витальевич (RU),
 Очеретенко Дмитрий Петрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) ШТАММ *Micrococcus* sp., ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО АЗОТА, АММОНИЙ-ИОНА, ЖЕЛЕЗА И АЛЮМИНИЯ В СТОЧНЫХ ВОДАХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен штамм *Micrococcus* sp. ВКМ Ас-2632D, предназначенный для снижения содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия в сточных водах

очистных сооружений промышленных предприятий. Штамм проявляет активность в снижении содержания общего азота на 53%, аммоний-иона - на 35%, железа - на 84% и алюминия - на 31%.

RU 2 567 010 C1

RU 2 567 010 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 567 010**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.

C02F 3/34 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/265 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014126253/10, 27.06.2014

(24) Effective date for property rights:
27.06.2014

Priority:

(22) Date of filing: 27.06.2014

(45) Date of publication: 27.10.2015 Bull. № 30

Mail address:

167982, g. Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja, 28,
Institut biologii Komi nauchnogo tsentra UrO RAN,
patentno-informatsionnaja gruppya

(72) Inventor(s):

Shchemelinina Tat'jana Nikolaevna (RU),
Anchugova Elena Mikhajlovna (RU),
Markarova Marija Jur'evna (RU),
Volodin Vladimir Vital'evich (RU),
Ocheretenko Dmitrij Petrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

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

(54) **STRAIN *Micrococcus* sp., INTENDED FOR REDUCTION OF CONTENT OF TOTAL NITROGEN, AMMONIUM-ION, IRON AND ALUMINIUM IN SEWAGE WATER OF TREATMENT FACILITIES OF INDUSTRIAL ENTERPRISES**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to field of biotechnology. Claimed is strain *Micrococcus* sp. VKM Ac-2632D, intended for reduction of content of total nitrogen, ammonium-ion, iron and aluminium in sewage

water of treatment facilities of industrial enterprises.

EFFECT: strain demonstrates activity in reduction of total content of nitrogen by 53%, ammonium-ion - by 35%, iron - by 84% and aluminium - by 31%.

R U 2 5 6 7 0 1 0 C 1

R U 2 5 6 7 0 1 0 C 1

Изобретение относится к области биотехнологии и касается получения нового штамма бактерий, эффективного для очистки сточных вод промышленных предприятий от общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

Известен штамм *Micrococcus luteus* (Schroder 1872) ПБТ-1 [RU, патент №2488630, приоритет от 11.05.2012 г., опубликовано 27.07.2013 г.], обладающий высокой каталазной активностью и способствующий повышению продуктивности агросистемы, участвуя в процессах трансформации органических остатков природного происхождения. Указанный штамм *Micrococcus luteus* способен к разложению растительных остатков, стимуляции роста и развитию проростков, к повышению всхожести редиса, в отличие от заявленного штамма *Micrococcus* sp. №3, предназначенного для очистки сточных вод очистных сооружений промышленных предприятий от общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

Известен способ очистки водоемов от нефтяных загрязнений [RU, патент №2025466, приоритет от 15.04.1991 г., опубликовано 30.12.1994 г.] путем обработки поверхности водоема клетками аэробных микроорганизмов, выбранными из группы культур, включающих микроорганизмы рода *Micrococcus*.

Известен консорциум микроорганизмов - деструкторов [RU, заявка на изобретение №2011136481, приоритет от 01.09.2011 г., опубликована 27.10.2013 г.]: *Alcaligenes* sp. Г0401 ВТ №17, *Micrococcus nishomyaensis* Г0402 ВТ №16, *Brevibacterium iodinum* Г0403 ВТ №15, *Pseudomonas aeruginosa* Г0404 ВТ №14, *Pseudomonas facilis* Г0405 ВТ №13, *Brevibacterium linens* Г0406 ВТ №12, *Bacillus subtilis* Г0407 ВТ №11, *Flavobacterium aquatile* Г0408 ВТ №10, *Clostridium butyricum* Г0409 ВТ №9, используемый для очистки природных и сточных вод, почв и почвогрунтов от нефти, нефтепродуктов и остаточной замазученности.

Известен биопрепарат-нефтедеструктор [RU, патент №2319740, приоритет от 21.01.2005 г., опубликовано 20.03.2008 г.], включающий культуру бактерий и микробное удобрение-носитель в виде высушенной биомассы микроорганизмов активного ила, сформированного при переработке отходов свиноводческих комплексов, содержащее нативные микроорганизмы: *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Micrococcus hylae*, *Arthrobacter viscosus*, *Bacillus licheniformis*, может быть использован для очистки загрязненной нефтью и нефтепродуктами почв при одновременном восстановлении физико-химических свойств и естественного биоценоза.

Данные способы используют штамм *Micrococcus* для очистки от нефтепродуктов в отличие от заявленного штамма *Micrococcus* sp. №3, предназначенного для очистки сточных вод очистных сооружений промышленных предприятий от содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

Известен способ получения (R)-1-арил-2-тетразолилэтилового эфира карбаминовой кислоты [RU, заявка №2508290, приоритет от 22.06.2009 г., опубликовано 27.02.2014 г.]. Для получения (R)-1-арил-2-тетразолилэтилового эфира карбаминовой кислоты необходимо биологическое асимметрическое восстановление, которое может быть выполнено в буфере, содержащем штамм микроорганизма, способный к продуцированию оксидоредуктазы. Штамм микроорганизма выбирают из группы, включающей дрожжи рода *Candida*, включая *Candida parapsilosis* и *Candida rigosa*; дрожжи рода *Pichia*, включая *Pichia anomala* и *Pichia jadinii*; дрожжи рода *Saccharomyces*, включая Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces pastorianus*; дрожжи, включающие *Rhodotorula mucilaginosa* или *Trigonopsis variabilis*; бактерии, включая *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Rhodococcus erythropolis* и *Rhodococcus rhodochrous*; грибы, включая *Mucor racemosus* и

Geotrichum candidum, и соответствующие комбинации. Т.е. в данном способе штамм *Micrococcus luteus* предназначен для продуцирования оксидоредуктазы, а не для очистки сточных вод очистных сооружений промышленных предприятий от содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

5 Известен способ получения дисахарида [RU, патент №2230119, приоритет от 11.10.2002 г., опубликовано 10.06.2004 г.], где в качестве исходного сырья для получения биологически активных веществ используют клеточные стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* (*Micrococcus luteus*). Способ включает культивирование штамма-продуцента *Micrococcus lysodeikticus* (*luteus*) и выход из исходного сырья дисахаридов.

10 Культивирование штамма *Micrococcus lysodeikticus* (*Micrococcus luteus*) в данном способе не предполагается использование этого штамма для очистки сточных вод очистных сооружений промышленных предприятий от содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

15 Известен биопрепарат БИАВА для рекультивации почв, способ его получения [RU, патент №2248255, приоритет от 05.09.2003 г., опубликовано 20.03.2005 г.], для рекультивации техногенно нарушенных объектов окружающей среды и восстановления плодородия почв, включающий пористый носитель и физиологически активные микроорганизмы, как денитрификаторы, в том числе на основе культуры *Micrococcus*. Данный способ предназначен для очистки техногенно нарушенных почв, в водных
20 средах не заявлен. Заявленные свойства (очистка сточных вод очистных сооружений промышленных предприятий от содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия) в данном способе на культуру *Micrococcus* не указаны.

25 Известен способ использования биомассы *Micrococcus luteus* [RU, патент №2420541 приоритет от 11.01.2009 г., опубликовано 10.06.2011 г.], в виде продукта ее щелочного гидролиза в качестве пигмента для полимерной окрашенной композиции. Из биомассы культуры *Micrococcus luteus* выделяют желтый пигментный препарат сарцинаксантин. Заявляемых свойств в данном способе использования штамма *Micrococcus luteus* не обнаружено.

30 Известны способы использования биомассы *Micrococcus luteus* для определения антигистоновой активности микроорганизмов [RU, патент №2203956, приоритет от 06.12.2001 г., опубликован 10.05.2003 г.], антилактоферриновой активности микроорганизмов [RU, патент №2156807, приоритет 16.08.1999 г., опубликовано 10.02.2000 г.], антикарнозиновой активности микроорганизмов [RU, патент №2132879, приоритет 27.04.1998 г., опубликовано 10.07.1999 г.], антилизоцимной активности
35 микроорганизмов [RU, патент №2126051, приоритет 27.01.1997 г., опубликовано 10.02.1999 г.]. Штамм культуры *Micrococcus luteus* используется как тест-культура к бактерионосительству, микробиологического мониторинга антропогенного загрязнения окружающей среды, диагностики дисбиозов, изучения влияния лекарственных препаратов на персистентные характеристики микроорганизмов. Таким образом, в
40 данных способах не предполагает использование этого штамма для очистки сточных вод очистных сооружений промышленных предприятий от содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

Задача изобретения - выявление из рода *Micrococcus* штамма, обладающего новыми свойствами.

45 Технический результат настоящего изобретения заключается в выделении штамма *Micrococcus* sp. №3, участвующего в процессах очистки сточных вод очистных сооружений промышленных предприятий от общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

Согласно изобретению указанный технический результат достигается тем, что выявлен новый штамм *Micrococcus* sp. №3, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов, присвоен номер ВКМ Ас-2632D, предназначенный для снижения содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия в сточных водах очистных сооружений промышленных предприятий.

Штамм *Micrococcus* sp. №3 ВКМ Ас-2632D выделен в 2012 году из пробы сточной воды аэротенков целлюлозно-бумажного предприятия путем высева водного разведения испытуемой пробы методом предельных разведений аликвоты по 100 мкл на поверхность агаризованной среды МПА. Далее выделенную культуру изучали с целью установления ее каталитической способности к процессам очистки сточных вод от основных загрязняющих веществ. Штамм проявил значительную активность в снижении содержания общего азота (53%), аммоний-иона (35%), биосорбции железа (84%) и алюминия (31%).

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 - Пептон 20 г, KCl - 1,0 г; MgSO₄×5H₂O - 0,5 г; NaCl - 3,0; 15-25°C, 3-5 суток в условиях жидкофазной ферментации.

Родовое название *Micrococcus*. Штамм характеризуется следующими признаками: Колонии мелкие, круглые с ровным краем, объемные, непрозрачные, матовые, ярко-желтого цвета. Консистенция мягкая. Пигмента в среду не выделяет. Каталазный тест - положительный. Строгий аэроб. Клетки ~1 мкм, равномерно окрашены, неправильной округлой формы, образуют дипло- и тетракокки.

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 3 месяца с хранением выросшей чистой культуры на скошенном агаре среды следующего состава: на 1000 мл воды - Пептон 20 г, NaCl - 3,0 г; KCl - 1,0 г; MgSO₄×5H₂O - 0,5 г; агар микробиологический - 20,0; в закрытых пробирках в холодильнике при температуре не выше +6 и не ниже +1°C.

Род *Micrococcus* на сегодняшний день насчитывает 8 видов, в число которых входит *Micrococcus luteus*.

Видовое название *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872.

Наименование микроорганизма, опознавательная ссылка, присвоенная депозитором - *Micrococcus* sp. №3.

Определение филогенетического положения штамма *Micrococcus luteus* проводили при помощи анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК.

Для экстракции ДНК из культур использовали метод [Ausubel F.M, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current protocols in Molecular Biology. N.Y.: John Wiley and Sons. 1994].

Ген 16S рРНК амплифицировали с универсальными эубактериальными праймерами 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492 г (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [Lane, D.J. 16/23S sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics /Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: Wiley. 1991. P. 115-175; Medlin L., Etwood H.J., Stickel S., Sogin M.L. The characterisation of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA

coding regions // Gene. 1998. V. 71. P. 491-499]. ПЦР проводили на приборе GeneAmp PCR System 2700 (“Applied Biosystems”, США).

5 Определение нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

Филогенетический анализ. Предварительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК проводили в программе BLAST банка генов национального центра биологической информации (NCBI).
10 Последовательности генов 16S рРНК выравнивали с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы MEGA версии 5 [Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. 2011. (submitted)]. Определение
15 филогенетического положения штаммов и процента сходства проводили с использованием инструментов сайта EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) [Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K, Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species // Int J Syst Evol Microbiol. 2012. 62, 716-721].

20 Способность штамма к снижению содержания основных загрязняющих веществ, присутствующих в сточной воде очистных сооружений лесопромышленных комплексов изучали в лабораторных опытах со сточной водой, взятой из аэротенков ОАО «Монди СЛПК». Результаты приведены в примерах ниже.

Пример 1

25 а) Приготовление культуральной жидкости микроорганизмов

На 1 л воды добавляли NaNO_3 - 2.0 г; KH_2PO_4 - 1.0 г; KCl - 0.5 г; $\text{MgSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - 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
30 приготовленной суспензией живой культуры *Micrococcus* sp. №3 ВКМ Ас-2632D по 10 мкл при комнатной температуре в стерильных условиях, с титром живых клеток 10 млрд.клеток/1 мл в количестве 1 мл на колбу.

Наработка биомассы культуры микроорганизмов проводилась в колбах на 250 мл на термостатированной установке выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250 при
35 температуре 30°C и 180 оборотах в минуту в течение 3 суток.

б) Определение каталитической способности штамма *Micrococcus* sp. №3 ВКМ Ас-2632D Ас-2632D

40 В колбы на 250 мл была налита сточная вода аэротенков ОАО «Монди СЛПК» в количестве 150 мл и одновременно введен штамм *Micrococcus* sp. №3 ВКМ Ас-2632D в количестве 0.15 мл с титром клеток 10^{10} КОЕ. Опыт проводился на термостатированной установке выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250 при температуре 30°C и 180 оборотах в минуту в течение 1 суток. Результаты анализов представлены в таблице.

Таблица

Вариант	БПК	N _{общ.}	NH ₄	Fe	Al
	мкг/дм ³				
5 Сточная вода аэротенков ОАО «Монди СЛПК»	230.0±14.0	7.1±1.3	0.17±0.04	1.23±0.18	140.0±30.0
Сточная вода аэротенков ОАО «Монди СЛПК» спустя сутки	130.0±7.8	7.0±1.3	0.16±0.04	1.22±0.18	140.0±30.0
10 Сточная вода аэротенков ОАО «Монди СЛПК» 150 мл + 0,15 мл штамма штамм <i>Micrococcus</i> sp. № 3 ВКМ Ас-2632D титром клеток 10 ¹⁰ КОЕ.	88±0.8	3.3±0.6	0.11±0.02	0.19±0.05	96.0±23.0

Как видно из представленных в таблице результатов - в сравнении с контролем, в пробах сточной воды с введенным штаммом произошло снижение содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия.

15 Штамм *Micrococcus* sp. №3 ВКМ Ас-2632D хранится в ФГБУН Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН). Просп. Науки, д. 5, г. Пушкино, Московской области, 142290.

Данные идентификации *Micrococcus* sp. №3 ВКМ Ас-2632D

20 CATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGCGAACGGGTG
 AGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCT
 AATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTG
 GATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
 25 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGMAAGCCTGATGCAG
 CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAG
 AAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
 30 GCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
 AGGCGGTTTTGTCGCGTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGG
 GTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGA
 ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACT
 35 GACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 TGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCACGGTTTCCGCGCCGCA

ШТАММ *Micrococcus* sp. №3 ВКМ АС-2632D

40

45

Таблица

Вариант	БПК	N _{общ.}	NH ₄	Fe	Al
	мкг/дм ³				
5 Сточная вода аэротенков ОАО «Монди СЛПК»	230.0±14.0	7.1±1.3	0.17±0.04	1.23±0.18	140.0±30.0
Сточная вода аэротенков ОАО «Монди СЛПК» спустя сутки	130.0±7.8	7.0±1.3	0.16±0.04	1.22±0.18	140.0±30.0
10 Сточная вода аэротенков ОАО «Монди СЛПК» 150 мл + 0,15 мл штамма штамм <i>Micrococcus</i> sp. № 3 ВКМ Ас-2632D титром клеток 10 ¹⁰ КОЕ.	8.8±0.8	3.3±0.6	0.11±0.02	0.19±0.05	96.0±23.0

Формула изобретения

15 Штамм *Micrococcus* sp. №3 депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов, номер ВКМ Ас-2632D, предназначен для снижения содержания общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия в сточных водах очистных сооружений промышленных предприятий.