

(19) **KG** (11) **1204** (13) **C1** (46) **30.12.2009**

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(51) *C12N 1/26* (2009.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(19) **KG** (11) **1204** (13) **C1** (46) **30.12.2009**

(21) 20080061.1

(22) 12.05.2008

(46) 30.12.2009, Бюл. №12

(76) Доолоткельдиева Т., Конурбаева М. (KG)

(56) Патент RU №2312719, кл. B09C 1/10, C12N 1/26, 2007

(54) **Угледородоокисляющий штамм *Pseudomonas fluorescens*, используемый для очистки окружающей среды от нефтепродуктов**

(57) Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии. Задачей изобретения является получение угледородоокисляющего штамма, очищающего окружающую среду от концентрированных загрязнений нефтепродуктами и обладающего более высокой жизнеспособностью клеток в окружающей среде. Поставленная задача решается в получении угледородоокисляющего штамма *Pseudomonas fluorescens*, используемого для очищения окружающей среды от нефтепродуктов. Предлагаемый псевдомонад, созданный на основе естественной микрофлоры, является экологически безопасным для очистки окружающей среды от загрязнения нефтепродуктами. 3 табл.

(21) 20080061.1

(22) 12.05.2008

(46) 30.12.2009, Bull. №12

(76) Doolotkeldieva T., Konurbaeva M. (KG)

(56) Patent RU №2312719, cl. B09C 1/10, C12N 1/26, 2007

(54) **Hydrocarbon oxygenating strain *Pseudomonas fluorescens*, using for clearing of the environment from petrochemicals**

(57) Invention concerns the microbiological industry and biotechnology. The invention problem is reception of the hydrocarbon oxygenating strain, clearing the environment off concentrated petrochemicals pollutions, and possessing higher cells viability in the environment. The assigned task solves by the reception of hydrocarbon oxygenating strain *Pseudomonas fluorescens*, used for clarification of the environment from petrochemicals. Offered pseudomonade, created on the basis of natural microflora, intended for clearing of the environment from petrochemicals pollution, is ecologically safe. 3 tables.

Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии.

Известен консорциум штаммов угледородоокисляющих бактерий *Pseudomonas aeruginosa* НД КЗ-1 и *Pseudomonas fluorescens* НД КЗ-2 в качестве деструктора нефтепродуктов и

способ очистки нефтезагрязненных подземных вод (Патент RU №2312719, кл. B09C 1/10, C12N 1/26, 2007).

Недостатком данного консорциума штаммов является их относительно низкая нефтеокисляющая активность.

Также известны штаммы микроорганизмов – деструкторов *Saccharomyces* sp. и *Pseudomonas* sp., используемые для биоремедиации нефтезагрязненных объектов окружающей среды, и ассоциация на их основе (Патент RU №2272071, кл. C12N 1/26, 1/20, 1/14, C12R 1/38, 1/85, 2007).

Недостатком данного консорциума является низкая деструктивная способность этих штаммов, так как они могут деградировать нефтепродукты, содержание которых составляет всего до 1% в загрязненной среде.

Задачей изобретения является получение углеводородоокисляющего штамма, очищающего окружающую среду от концентрированных загрязнений нефтепродуктами и обладающего более высокой жизнеспособностью клеток в окружающей среде.

Поставленная задача решается в получении углеводородоокисляющего штамма *Pseudomonas fluorescens*, используемого для очищения окружающей среды от нефтепродуктов.

Номенклатурные данные: порядок Pseudomonadales, семейство Pseudomonaceae, род *Pseudomonas*, Migula 1900, вид *Pseudomonas fluorescens* 3 биовар.

Морфолого-культуральные признаки штамма *Pseudomonas fluorescens*: клетки *Pseudomonas* – обычно прямые, иногда слегка изогнутые, подвижные палочки.

Размеры клеток колеблются от 0.5 до 1 мкм в диаметре, до 1.5-4.0 мкм в длину.

Колонии округлые с ровными краями, слизистые, поверхность выпуклая, блестящая. В среде мясопептонного агара, Кинг В. – выделяет обильный желто-зеленый пигмент.

pH: оптимальный 6.8-7.2.

Температура скорости роста клеток: оптимальная 25-27°C.

Физиолого-биохимические свойства.

Отношение к источникам углеводов: хорошо усваивает сахарозу, глюкозу, L-аргинин; удовлетворительно – мальтозу арабинозу, маннит, сорбит; плохо – дульцит, бутират.

Отношение к источникам азота: хорошо усваивает пептон, удовлетворительно – серноокислый аммоний, плохо – казеин.

Крахмал гидролизует плохо, желатин разжижает, молоко не коагулирует, активный денитрификатор.

Обладает аргининдегидролазой и лецитиназой. Сапрофит, не является патогенной культурой.

Зрелая культура на агаровых питательных средах хранится в холодильнике при (-2) - (+5)°C с периодическими пересевами 4-5 раз в течение года. При соблюдении этих условий стабильность штамма *Pseudomonas fluorescens* сохраняется в течение 4-5 лет.

Для определения эффективности биопрепарата измеряют количество остаточного бензина весовым методом. Для этого после окончания роста содержимое колб подвергают экстракции хлороформом. Пробы культуральной жидкости и контроля объемом по 100 мл экстрагируют встряхиванием с 50 мл хлороформа в течение 30 мин. Хлороформный экстракт отделяют центрифугированием в течение 30 мин при 4000 об/мин и высушивают в стакане над 3 г безводного сульфата натрия. Аликвоты (5 мл) хлороформного экстракта переносят в предварительно взвешенные с точностью до 0.0001 г градуированные пробирки объемом 10 мл. Для удаления хлороформа пробирки в положении под углом 45° помещают в вентилируемый термостат при 70-75°C на 3.5-4 ч, выдерживают при 35-40°C в течение ночи и взвешивают (Pi). Оценка нефтеразлагающей активности (A) весовым способом осуществляется с учетом данных, полученных для контроля:

$$A(\%) = (P_{\text{контр}} - P_i) / (P_{\text{контр}} \times 100).$$

Пример 1.

Посевной материал – штамм *Pseudomonas fluorescens*, культивируют на мясопептонном агаре. Биомассу микроорганизмов добавляют к питательной среде в количестве 10⁵ кл/мл. В качестве жидких питательных сред использованы среды следующего состава:

1. NaCl - 5г/л

питательный бульон	8 г/л
глюкоза	7 г/л
вода	1000 мл

pH	7.0
2. Кормовые дрожжи (БВК) - 2 г/л	
кукурузный экстракт	1 г/л
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1г/л
вода	100 мл
pH	7.0

Для приготовления препарата культуру штамма *Pseudomonas fluorescens* выращивают в колбах на круговых качалках при скорости вращения 240 об /мин в течение 2-х суток. Температуру в колбах поддерживают в пределах 26-28°C. После окончания питательную среду центрифугируют, разбавляют стабилизаторами и разливают в тару. Жидкая ферментированная среда содержит примерно $3-5 \times 10^5$ жизнеспособных клеток на один миллилитр среды.

Пример 2.

Изучение нефтеокисляющей способности псевдомонад в жидкой среде.

В лабораторных условиях исследовали углеводородоокисляющее свойство биопрепарата в жидкой среде, содержащей различный диапазон концентраций бензина. Для проведения опытов, была использована жидкая среда, содержащая речную воду, очищенную от микроорганизмов, с добавлением минеральных солей и бензина.

Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл жидкой среды и различные концентрации бензина, на круговой качалке (180 об/мин) при 24°C в течение 5-ти суток. Штамм *Pseudomonas fluorescens* оказался устойчивым к высоким концентрациям бензина (в 100 раз выше ПДК) в жидкой среде. Чувствительность псевдомонад к содержанию в жидкой среде высоких концентраций бензина выражался характером роста колоний и численностью колониеобразующих единиц (КОЕ).

В колбы с бензином были внесены суспензии с микроорганизмами (с титром 10^6 клеток на 1мл).

Оптическую плотность определяли на ФЭК-КФК-2 при длине волны 540 нм и толщине кюветы 5.075 см.

При дозе 0.1 мг/л (в 2 раза превышающей ПДК) наибольшее количество КОЕ было получено из 72-часовой культуры, значительное число выросло из 36 и 125 –часовой культуры. При дозах 0.2 мг/л и 0.3 мг/л (в 4 и 6 раз превышающей ПДК) наибольшее количество КОЕ было получено из 36-часовой культуры.

При увеличении дозы до 50 раз и 100 раз (табл. 1), превышающей ПДК, наблюдается уменьшение числа выросших КОЕ *Pseudomonas fluorescens*, в первых фазах развития бактерий.

Эти данные указывают, что высокие дозы бензина ингибируют процессы, связанные с делением и размножением клеток. Затем в последующие часы (через 72 часа) наблюдается возрастание выросших клеток, КОЕ на среде (рис. 1).

Таким образом, эффективность утилизирующей способности *Pseudomonas fluorescens* была высока при внесении бензина в дозах 2, 4, 6 и 50 раз больше ПДК. Эта способность культуры четко проявляется через 36 часов после инкубации.

Пример 3.

Изучение нефтеокисляющей способности псевдомонад в почве.

Нефтеокисляющий потенциал бактерий рода *Pseudomonas*, на примере бензина, с разными концентрациями, исследовали в почве. Использовали метод глубинного посева из чистых культур бактерий *Pseudomonas fluorescens* в концентрации 10^5 кл/мл. В средах с различными концентрациями бензина показатели резко варьируют. Так, в среде с концентрацией бензина 125 мг/л в 250 раз выше ПДК, отмечается значительное увеличение клеток (194 тыс. клеток), чем при дозе ПДК (0.05мг/л – 152 тыс. клеток). При дозе равной 75 мг/л (114 тыс. клеток), отмечалось ингибирование роста клеток, численность меньше в 2 раза, по сравнению с контролем. При концентрации 250 мг/л (в 500 раз выше ПДК), количество клеток возрастает по сравнению с ПДК, но меньше на небольшое количество клеток, чем в концентрации 125 мг/л, рост клеток остается относительно стабильным.

Результаты исследований показали (табл. 2), что при высоком содержании бензина, в дозе 500 мг/л – полное угнетение роста клеток не наблюдается, снижается рост клеток, соответственно и деструктивная активность штамма падает (рис. 3). При микроскопировании палочки, имеющие

прямую или слегка изогнутую форму, с каждым увеличением дозы бензина, раздувались, образуя сферическое тело.

Пример 4.

Были проведены модельные опыты, экспериментальная очистка биопрепаратом на основе штамма *Pseudomonas fluorescens*. В сосуды, наполненные почвой (темно-каштановые), с внесением гумуса, в количестве 5%, масса почвы 500 г, вносили биопрепарат в количестве 2 г на 1 кг почвы, 1 г псевдомонада, содержащем 10 КОЕ, содержание бензина 500 мг/кг почвы. Сосуды выдерживали при комнатной температуре, в течение 3-х месяцев. Опыт был проведен в трехкратной повторности. Перед началом опыта весовым методом определяли количественное содержание бензина, в течение 3-х месяцев велось наблюдение. Результаты представлены в табл. 3.

Как показывают данные табл. 3, в течение 3 месяцев в результате применения бактерий псевдомонад, степень очистки от бензина снизилась до 92.6 %.

Таблица 1

ПДК	0.05 мг/л
В 2 раза >	0.1 мг/л
В 4 раза >	0.2 мг/л
В 6 раз >	0.3 мг/л
В 50 раз >	2.5 мг/л
В 100 раз >	5.0 мг/л
Контроль	—

Таблица 2

ПДК	0.05 мл/л
В 150 раза >	75 мл/л
В 250 раза >	125 мл/л
В 500 раз >	250 мл/л
В 1000 раз >	500 мл/л
Контроль	—

Таблица 3

Время проведения	Содержание бензина, %	Степень очистки, %
0	100	0
10	15.2	69.6
30	8.6	91.4
90	0.037	92.6

Формула изобретения

Угледородоокисляющий штамм *Pseudomonas fluorescens*, используемый для очистки окружающей среды от нефтепродуктов.

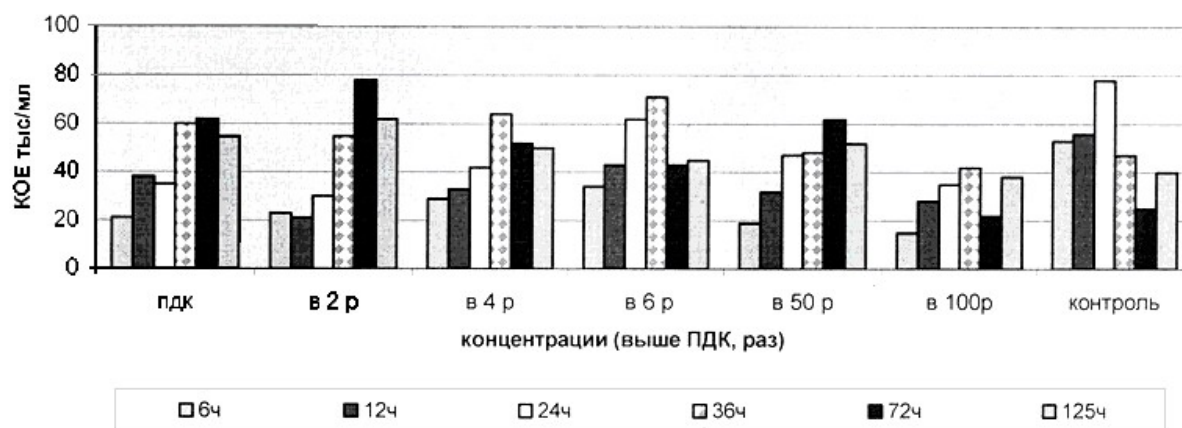


Рис. 1. Динамика КОЕ *Pseudomonas fluorescens*, в разных концентрациях бензина и на разных промежутках времени.

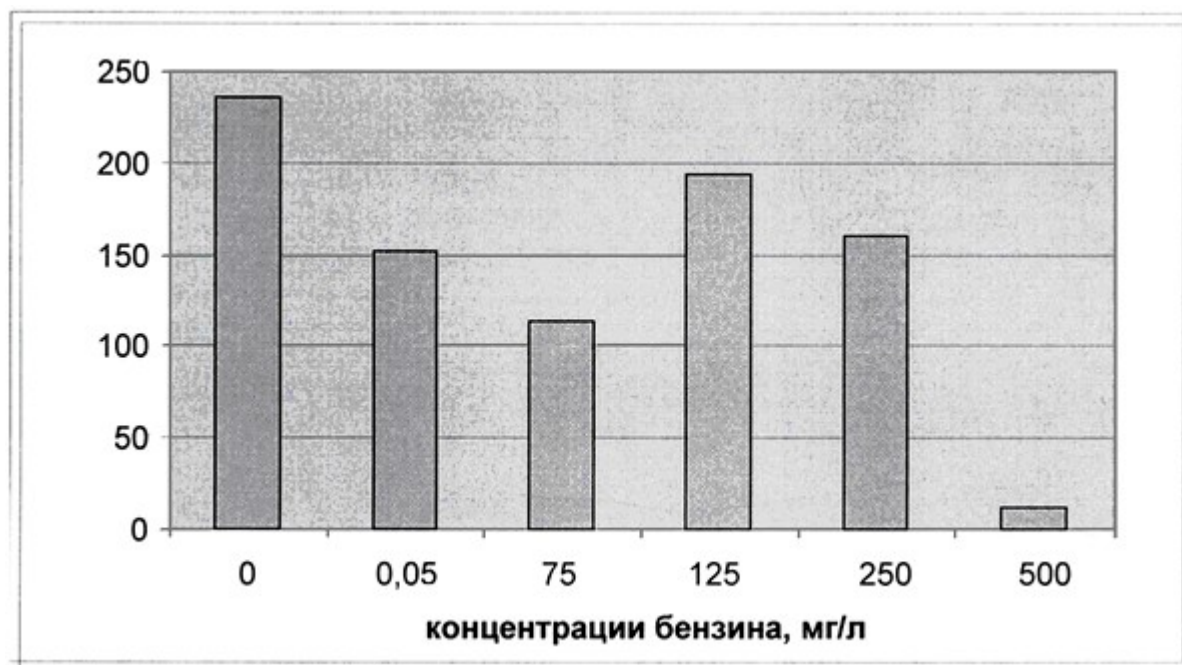


Рис. 2. Численность КОЕ штамма *Pseudomonas fluorescens* при разных концентрациях бензина

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Усубакунова З.К.
Чекиров А.Ч.

Государственная служба ИС КР, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03