

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2312719

**КОНСОРЦИУМ ШТАММОВ
УГЛЕВОДОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA НД КЗ-1 И PSEUDOMONAS
FLUORESCENS НД КЗ-2 В КАЧЕСТВЕ ДЕСТРУКТОРА
НЕФТЕПРОДУКТОВ И СПОСОБ ОЧИСТКИ
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД**

Патентообладатель(ли): *Общество с ограниченной
ответственностью "ЛУКОЙЛ-ПЕРМЬ" (RU)*

Автор(ы): *Максимович Николай Георгиевич (RU), Хмурчик
Вадим Тарасович (RU)*

Заявка № 2006104797

Приоритет изобретения 15 февраля 2006 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 20 декабря 2007 г.

Срок действия патента истекает 15 февраля 2026 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной
собственности, патентам и товарным знакам



Б.П. Симонов



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006104797/13, 15.02.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.02.2006

(45) Опубликовано: 20.12.2007 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2232806 C2, 20.07.2004. RU 2043312 C1, 10.09.1995. RU 2107722 C1, 27.03.1998. RU 2093478 C1, 20.10.1997. DE 4311981, 17.02.1994. МУРЫГИНА В.П. и др. Очистка водной поверхности и грунтов от нефтяных загрязнений биопрепаратом «Родер», Экология и промышленность России, август, 1999, с.16-19. КОРОНЕЛЛИ Т.В. Принципы и методы интенсификации (см. прод.)

Адрес для переписки:

614990, г.Пермь, ул. Ленина, 62, ООО "ЛУКОЙЛ-ПЕРМЬ", отдел производственных проектов и программ, Г.И. Селезневой

(72) Автор(ы):

Максимович Николай Георгиевич (RU),
Хмурчик Вадим Тарасович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"ЛУКОЙЛ-ПЕРМЬ" (RU)

(54) КОНСОРЦИУМ ШТАММОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS AERUGINOSA НД КЗ-1 И PSEUDOMONAS FLUORESCENS НД КЗ-2 В КАЧЕСТВЕ ДЕСТРУКТОРА НЕФТЕПРОДУКТОВ И СПОСОБ ОЧИСТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Консорциум штаммов углеводородокисляющих бактерий Pseudomonas aeruginosa НД КЗ-1 и Pseudomonas fluorescens НД КЗ-2 выделен из образцов почв и подземных вод карстовых полостей, отобранных на территории Пермской области, и депонирован в коллекции лаборатории геологической микробиологии Института экологии и генетики и микроорганизмов УрО РАН под номером НД-МК-17. Способ очистки нефтезагрязненных подземных вод включает закачку через скважину

и/или карстовую воронку консорциума штаммов углеводородокисляющих бактерий Pseudomonas aeruginosa. НД КЗ-1 и Pseudomonas fluorescens НД КЗ-2 в количестве 0,5-1,5 литра на 1 м³ подземных вод. Из скважины устройством периодически отбирают пробы для оценки эффективности деструкции нефти и по результатам анализа осуществляют корректировку биологической очистки подземных вод. Изобретение позволяет повысить эффективность очистки за счет снижения затрат и повышения степени очистки. 2 н.п. ф-лы, 1 табл.

(56) (продолжение):

биологического разрушения углеводов в окружающей среде. Прикладная биохимия и микробиология, 1996, т.32, №6, 579-585.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 312 719** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

B09C 1/10 (2006.01)

C12N 1/26 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006104797/13, 15.02.2006**

(24) Effective date for property rights: **15.02.2006**

(45) Date of publication: **20.12.2007 Bull. 35**

Mail address:

614990, g.Perm', ul. Lenina, 62, OOO "LUKOJL-PERM", otdel proizvodstvennykh proektov i programm, G.I. Seleznevoj

(72) Inventor(s):

**Maksimovich Nikolaj Georgievich (RU),
Khmurchik Vadim Tarasovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"LUKOJL-PERM" (RU)**

(54) **CONSORTIUM OF STRAINS OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA PSEUDOMONAS AERUGINOSA ND K3-1 AND PSEUDOMONAS FLUORESCENS ND K3-2 AS HYDROCARBON DESTRUCTOR AND A METHOD OF TREATING OIL-POLLUTED SUBSURFACE WATERS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology and oil pollution elimination.

SUBSTANCE: consortium of strains as indicated in the title is isolated from samples of diols and subsurface waters of caverns taken in Perm region territory and deposited in collection of geological microbiology laboratory, Institute of ecology and genetics of microorganisms, Ural Department of Russian Academy of Sciences, under name ND-MK-17. Method of treating oil-polluted

subsurface waters comprises injecting, through well and/or sluggy, consortium of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria in amount 0.5-1.5 L per 1 m³ subsurface water and then samples to estimate oil destruction efficiency are taken. According to analysis results, biological treatment of subsurface water is adjusted.

EFFECT: enhanced treatment efficiency and reduced expenses.

1 tbl, 2 ex

RU 2 3 1 2 7 1 9 C 1

RU 2 3 1 2 7 1 9 C 1

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к способам очистки подземных вод, загрязненных нефтью, с помощью консорциума штаммов бактерий деструкторов нефти.

Известны способы очистки загрязненных подземных вод с помощью культур анаэробных (сульфатредуцирующих) микроорганизмов (пат. RU №2107042, МПК C02F 3/34, бюл. №8, 1998 г.; RU №1838598, МПК E21B 43/28, 1984 г.; а.с. SU №1264634, МПК C02F 3/34, 1993 г.). Недостатками данных способов являются, во-первых, большая трудоемкость и техническая сложность работ по выделению анаэробных микроорганизмов и наращиванию их биомассы. Во-вторых, использование анаэробных микроорганизмов оправдано для подземных вод, не содержащих растворенного кислорода, являющегося токсичным для данных микроорганизмов, и следовательно, они не могут быть использованы для обработки карстовых подземных вод, содержащих растворенный кислород.

Известен консорциум штаммов микроорганизмов BACILIUS BREVIS и ARTHROBACTER SPECITS, используемый для очистки воды и почв от нефти и нефтепродуктов (пат. RU №2232806, МПК C12N 1/20, C02F 3/34, бюл. №20, 2004 г.). В состав консорциума, депонированного, коллекции микроорганизмов Института биологии Уфимского научного центра РАН под № НБ ДТ-5, входят штаммы BACILIUS BREVIS ДТ-5-1 (51%) и ARTHROBACTER SPECITS ИБ ДТ-5-3 (49%). Консорциум выделен из почвы, загрязненной дизельным топливом. Прототип для заявляемого консорциума микроорганизмов. Недостатком способа следует признать его низкую эффективность в случаях высокой степени загрязненности нефтью.

Известен способ очистки грунтовых вод, загрязненных нефтепродуктами, с использованием бактериальных культур природных штаммов, выделенной из грунтовой воды (пат. RU №2043312 МПК C02F 3/34, E21B 43/22, бюл. №25, 1995 г.). Прототип для предлагаемого способа очистки нефтезагрязненных карстовых подземных вод. По способу проводят оценку степени загрязнения грунтовых вод, бурение скважин, откачку грунтовых вод, аэрацию и возврат их в водоносный горизонт. При этом предварительно выделяют бактериальную культуру природного штамма из грунтовой воды, определяют наиболее активные и нарабатывают их биомассу, после чего осуществляют откачку воды, удаляют из нее отстой и при остаточном содержании нефтепродуктов в воде 0,1-1,0 г/л вводят в воду биомассу в смеси с К, N, P-содержащими удобрениями и микроэлементами. Откачку воды, ее отстой и аэрацию производят в скважине, периодически повторяя процесс, с последующим введением туда же биомассы.

Недостатками способа являются большая трудоемкость работ и материальные затраты, связанные с предварительной откачкой воды, ее отстаиванием и аэрацией, добавочной аэрацией пласта для создания аэробных условий в объеме грунтов (вод), а также применимость способа только при низком остаточном содержании нефтепродуктов в воде (до 1 г/л).

Задачей создания изобретения является получение консорциума штаммов бактерий, обладающего высокой нефтедеструктурирующей активностью, а также разработка на его основе высокоэффективного способа очистки нефтезагрязненных подземных вод.

Технический результат, получаемый в результате реализации изобретения, состоит в улучшении эффективности очистки за счет снижения затрат и повышения степени очистки.

Для достижения указанного технического результата предложен Консорциум штаммов углеводородокисляющих бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. НД К 3-1 и *Pseudomonas fluorescens* НД К 3-2 [депонированного в коллекции лаборатории геологической микробиологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН под № НД-МК-17], в качестве деструктора нефтепродуктов.

Для достижения указанного технического результата предлагается использовать выделенный консорциум штаммов бактерий, обладающий высокой нефтедеструктурирующей активностью, который вносят в нефтезагрязненные подземные воды через скважины и/или карстовые воронки. Способ очистки нефтезагрязненных подземных вод включает закачку через скважину и/или карстовую воронку деструктора нефтепродуктов. В качестве

деструктора нефтепродуктов используют консорциум штаммов углеводородокисляющих бактерий *Pseudomonas aeruginosa* НД К 3-1 и *Pseudomonas fluorescens* НД К 3-2 в количестве 0,5-1,5 литра на 1 м³ подземных вод, затем из скважины устройством (например, пробоотборником) периодически отбирают пробы для оценки эффективности 5
деструкции нефти и по результатам анализа осуществляют корректировку биологической очистки подземных вод.

Если взять консорциум штаммов в количестве менее 0,5 л/м³, то не достигается эффективная очистка подземных вод.

Если взять консорциум штаммов в количестве более 1,5 л/м³, то не оправданно 10
возрастают затраты на очистку подземных вод.

Патентные исследования показали, что решений, имеющих признаки, сходные с отличительными признаками предлагаемого технического решения, не выявлены, что дает право судить о существенности отличий этих признаков, а совокупность всех признаков 15
придает изобретению новый технический результат.

Вышеперечисленные признаки позволяют эффективно решать поставленную задачу.

Указанные выше отличительные признаки, каждый в отдельности и все совместно, направлены на решение поставленной задачи и являются существенными. Использование 20
существенных отличительных признаков в известном уровне техники не обнаружено, следовательно, предлагаемое техническое решение соответствует критерию патентоспособности «новизна».

Единая совокупность новых существенных признаков с общими, известными обеспечивает решение поставленной задачи и свидетельствует об успешном 25
промышленном применении предлагаемого решения.

Полученный консорциум штаммов бактерий выделен из образцов почв и подземных вод карстовых полостей, отобранных на территории НГДУ (пос. Полазна Пермской обл.). Основная физиологическая особенность консорциума, имеющая практическое значение, - 30
деструкция углеводородов нефти. Консорциуму присвоен номер МК-17, консорциум хранится в коллекции лаборатории геологической микробиологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН под коллекционным номером НД-МК-17. Для выделения консорциума применяли прямой высев из отобранных образцов почвы и воды с 35
последующим получением накопительной культуры вначале на жидкой среде Раймонда с 0,5% сырой нефти, а затем на агаризованной среде того же состава.

Ступенчатую аналитическую селекцию вели по принципу отбора микроорганизмов с высокой деструктирующей активностью по отношению к углеводородам. Все культуры 40
консорциума - мезофилы, с границами хорошего роста и высокой активности в пределах 15-35°C при оптимуме 26±2°C. Консорциум представляет собой естественное неделимое сообщество, состоящее из двух штаммов бактерий.

Высев моноколониальных изолятов на среды с различными источниками углерода, неспособность их к накоплению в качестве запасного источника углерода 45
поли-β-оксибутирата, образование флуоресцирующих диффундирующих пигментов, грамотрицательная окраска клеточной стенки, отсутствие потребности в органических факторах роста, положительный результат теста на наличие оксидазы, наличие каталазы, дыхательный тип метаболизма, способность к денитрификации и росту при различных 50
температурах, неспособность к фиксации атмосферного азота, неспособность к росту в кислой среде (рН 4,5), подвижность клеток при фазовоконтрастном микроскопировании обосновали определение видового состава консорциума.

Характеристика штамма *Pseudomonas aeruginosa* НД К 3-1. Подвижные палочки 0,5-0,6×1,5-3,0 мкм. Растет при +41°C, не растет при +4°C. Гидролизует желатину, не 55
гидролизует крахмал. В качестве источника углерода использует глюкозу, β-кетоглюконат, L-валин, DL-аргинин. Не использует мезо-инозит, трегалозу. Обладает аргининдегидролазой. Не обладает лецитиназной активностью. Способен к денитрификации нитрата. Сапрофит.

Характеристика штамма *Pseudomonas fluorescens* НД К 3-2. Подвижные палочки 0,5-1,0×1,5-5,0 мкм. Растет при +4°C, не растет при +41°C. Гидролизует желатину, не гидролизует крахмал. В качестве источника углерода использует глюкозу, трегалозу, β-кетоглюконат, мезо-инозит, L-валин, L-аргинин, L-арабинозу, сахарозу, сорбит, пропионат. Не использует бутират. Обладает аргининдегидролазой и лецитиназой. Способен к денитрификации нитрата. Сапрофит.

Доминирующим компонентом консорциума являются бактерии штамма *Pseudomonas aeruginosa* НД К 3-1; количество их составляет 60-70%. Состав консорциума может меняться в зависимости от изменения фракционного состава используемой нефти. На более тяжелых нефтях доминирующим компонентом консорциума становятся бактерии штамма *Pseudomonas fluorescens* НД К 3-2; их количество составляет 55-65%.

Пример 1.

Для получения препарата консорциум штаммов бактерий НД-МК-17 выращивают на жидкой среде Раймонда с 1 мас.% глюкозы при комнатной температуре в течение 48-72 часов в аэробных условиях до достижения плотности популяции 10^9 - 10^{10} кл/мл, вносят сырую нефть в количестве 0,5-1 мас.% и продолжают культивирование в тех же условиях еще 24 часа. Добавляют азотсодержащую композицию (например, минеральное удобрение "Нитроаммофоска") в количестве 5 мас.%. Полученный препарат готов для внесения в нефтезагрязненные карстовые подземные воды через скважины и/или карстовые воронки.

Способ в соответствии с настоящим изобретением дополнительно поясняется с помощью приведенного ниже примера, не имеющего ограниченного характера.

Пример 2.

Нефтедеструктирующую активность консорциума микроорганизмов определяли по убыли индивидуальных компонентов нефти, регистрируемой общепринятыми методами газо-жидкостной хроматографии и ИК-спектроскопии в хлороформных экстрактах из опытных образцов воды, загрязненной 10 мас.% нефти и подвергнутой бактериальной обработке (2 об.% трехсуточной культуры консорциума с содержанием клеток $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл), по сравнению с контрольными образцами, не подвергнутыми бактериальной обработке. За 18 сут инкубации содержание n-алканов в нефти снизилось в 4,2 раза по сравнению с контролем за счет деструкции главным образом средних по массе углеводородов (n-C₁₇₋₂₆). Далее в таблице приведены сравнительные данные по утилизации нефтепродуктов консорциумами микроорганизмов.

Полученный согласно примеру 1 препарат после иммобилизации на полимерном волокне вносили в нефтезагрязненные подземные воды через скважину (воронку) с помощью специального устройства для отбора проб в количестве 1 л на 1 м³ карстовых подземных вод.

Иммобилизованный препарат выдерживали в скважине в течение 2-х недель, после чего отбирали пробу нефти из скважины для анализа. Химические анализы пробы нефти показали следующие результаты. Повышение точки начала кипения с 71°C до 77°C, увеличение массовой доли парафинов с 1,82% до 2,24% и повышение плотности нефти с 0,8401 до 0,8518 г/см³ свидетельствуют о том, что в результате деятельности бактерий консорциума в нефти произошли изменения, а именно исчезли самые легкие фракции. Увеличение обводненности нефти произошло в результате выделения углеводородокисляющими бактериями консорциума поверхностно-активных веществ, способствующих образованию эмульсии «вода в нефти».

Как показали вышеприведенные примеры, полученный консорциум штаммов бактерий может быть использован как препарат для очистки подземных вод от нефтяных загрязнений. Препарат предложено вносить в нефтезагрязненные подземные воды через скважины и/или карстовые воронки в количестве 0,5-1,5 л на 1 м³ подземных вод.

Таблица Утилизация нефти и нефтепродуктов консорциумами микроорганизмов		
Консорциум	Условия	Степень утилизации, мас.%
НД-МК-17	10 мас.% нефти в природной воде	76,35±5,95

Несмотря на то что были описаны предпочтительные варианты осуществления изобретения, совершенно ясно, что в него специалистами в данной области могут быть внесены изменения и дополнения, которые не выходят, однако, за рамки приведенной
5 далее формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Консорциум штаммов углеводородокисляющих бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. НД К 3-1 и *Pseudomonas fluorescens* НД К 3-2 (депонированного в коллекции лаборатории геологической микробиологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН под № НД-МК-17), в качестве деструктора нефтепродуктов.
10

2. Способ очистки нефтезагрязненных подземных вод, включающий закачку через скважину и/или карстовую воронку деструктора нефтепродуктов, отличающийся тем, что в качестве деструктора нефтепродуктов используют консорциум штаммов
15 углеводородокисляющих бактерий *Pseudomonas aeruginosa* НД К 3-1 и *Pseudomonas fluorescens* НД К 3-2 в количестве 0,5-1,5 литра на 1 м³ подземных вод, затем из скважины устройством периодически отбирают пробы для оценки эффективности деструкции нефти и по результатам анализа осуществляют корректировку биологической очистки подземных
20 вод.

25

30

35

40

45

50