

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2808248

### СОСТАВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский горный университет императрицы Екатерины II" (RU)*

Авторы: *Данилов Александр Сергеевич (RU), Дука Арина Александровна (RU), Иванченко Ольга Борисовна (RU), Созина Ирина Дмитриевна (RU)*

Заявка № 2023106274

Приоритет изобретения 17 марта 2023 г.

Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретений  
Российской Федерации 28 ноября 2023 г.

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает 17 марта 2043 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов







ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
B09C 1/10 (2023.08); C12N 1/00 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023106274, 17.03.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.03.2023

Дата регистрации:  
28.11.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.03.2023

(45) Опубликовано: 28.11.2023 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

190106, Санкт-Петербург, В.О., 21 линия, 2,  
ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский горный  
университет императрицы Екатерины II",  
Патентно-лицензионный отдел

(72) Автор(ы):

Данилов Александр Сергеевич (RU),  
Дука Арина Александровна (RU),  
Иванченко Ольга Борисовна (RU),  
Созина Ирина Дмитриевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Санкт-Петербургский горный  
университет императрицы Екатерины II"  
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2705290 C1, 06.11.2019. KZ 25271  
A4, 15.12.2011. RU 2736294 C1, 13.11.2020. WO  
2004094316 A2, 04.11.2004. CN 101301657 A,  
12.11.2008. CN 106754485 A, 31.05.2017. EA  
201800010 A1, 28.02.2019. РЕВИН В.В.,  
АТЫКЯН Н.А., КОСТИНА Е.Г., ГОГОТОВ  
И.Н., "Влияние кальция на изменение состава  
липидов клеток *Rhodococcus erythropolis* Ac-  
858 т в процессе (см. прод.)

## (54) СОСТАВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Состав для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами, содержит ассоциацию трех штаммов в виде смеси с содержанием каждого компонента не менее  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/мл, причем в качестве штаммов используют *Acinetobacter* sp. ВКМ В-3202, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-858<sup>T</sup>, *Pseudomonas alcaligenes*

ВКМ В-1295 в виде смеси бактериальных суспензий при следующих соотношениях, % по объему: штамм *Acinetobacter* sp. ВКМ В-3202 25%, штамм *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-858<sup>T</sup> 25-50%, штамм *Pseudomonas alcaligenes* ВКМ В-1295 50-25%. Изобретение позволяет разработать состав для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с высокой степенью очистки. 1 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

периодического и полунепрерывного культивирования на средах с различной концентрацией гексадекана", "Вестник Оренбургского государственного университета", N 11, ноябрь 2008, стр. 143-148.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*B09C 1/10* (2023.08); *C12N 1/00* (2023.08)

(21)(22) Application: **2023106274, 17.03.2023**

(24) Effective date for property rights:  
**17.03.2023**

Registration date:  
**28.11.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **17.03.2023**

(45) Date of publication: **28.11.2023 Bull. № 34**

Mail address:

**190106, Sankt-Peterburg, V.O., 21 liniya, 2, FGBOU  
VO "Sankt-Peterburgskij gornyj universitet  
imperatritsy Ekateriny II", Patentno-litsenziornyj  
otdel**

(72) Inventor(s):

**Danilov Aleksandr Sergeevich (RU),  
Duka Arina Aleksandrovna (RU),  
Ivanchenko Olga Borisovna (RU),  
Sozina Irina Dmitrievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Sankt-Peterburgskij gornyj  
universitet imperatritsy Ekateriny II" (RU)**

(54) **COMPOSITION FOR BIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH OIL AND PETROLEUM PRODUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: composition for bioremediation of soil contaminated with oil and petroleum products contains an association of three strains in the form of a mixture with each component containing at least  $1 \cdot 10^7$  CFU/ml, and the following is used as the strains: *Acinetobacter* sp. VKM B-3202, *Rhodococcus erythropolis* VKM Ac-858<sup>T</sup>, *Pseudomonas alcaligenes* VKM B-1295 in the form of a mixture of bacterial

suspensions at the following ratios, % by volume: strain *Acinetobacter* sp. VKM B-3202 25%, *Rhodococcus erythropolis* strain VKM Ac-858<sup>T</sup> — 25–50%, *Pseudomonas alcaligenes* strain VKM B-1295 — 50–25%.

EFFECT: invention makes it possible to develop a composition for the bioremediation of soils contaminated with oil and petroleum products with a high degree of purification.

1 cl, 1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к области охраны окружающей среды и биотехнологии и представляет собой ассоциацию микроорганизмов для очистки почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Известен биопрепарат «Родер» для очистки почв, почвогрунтов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов (Патент РФ № 2174496, опубл.: 10.10.2001) на основе бактерий рода *Rhodococcus*, дополнительно содержит R-формы родококков штаммов *Rhodococcus ruber* ВКМ Ас-1513Д и *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-1514Д, полученные путем селекции R-форм на обедненной питательной среде с концентрацией NaCl 10,0 г/л для биорекультивации загрязненных углеводородами объектов в условиях низкой минерализации или с концентрацией морской соли 30,0-50,0 г/л для биорекультивации в условиях высокой минерализации.

Недостатками данного изобретения являются низкая эффективность разложения нефти за один летний сезон до 65%, необходимость трехкратной обработки загрязненных участков в течение периода очистки, а также многоступенчатая технология получения указанных штаммов.

Известен биопрепарат для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов (Патент РФ № 2191752, опубл.: 27.10.2002), включающий аэробные нефтеокисляющие бактерии и воду, дополнительно содержит нефть, сахарозу и полиэтиленгликоль при следующем соотношении компонентов: нефть – 0,5-1 мас.%, сахароза – 1-5 мас.%, полиэтиленгликоль – 1-5 мас.%, вода – остальное, *Mycobacterium flavescens* ВКПМ В-6000 в конечной концентрации не менее  $1,2 \cdot 10^7$  кл/мл препарата, *Mycobacterium* sp. ИЖ 4 в конечной концентрации не менее  $2,5 \cdot 10^7$  кл/мл препарата, *Rhodococcus* sp. 56д в конечной концентрации не менее  $2 \cdot 10^7$  кл/мл препарата, *Acinetobacter* sp. НВ-1 в конечной концентрации не менее  $5 \cdot 10^7$  кл/мл препарата.

Недостатками данного изобретения являются многокомпонентный состав препарата, необходимость культивирования штаммов в ферментере, а также отсутствие доказательной информации об эффективности очистки почв от нефти и нефтепродуктов.

Известен препарат для биodeградации нефтепродуктов и способ его получения (Патент РФ № 2681831, опубл.: 12.03.2019), известный как биопрепарат «БИОМ», включающий ассоциацию бактерий *Bacillus megaterium* ВКПМ В-607, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-5328, *Pseudomonas putida* ВКПМ В-5624, *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ АС-1269, иммобилизованную на глауконитсодержащем носителе в количестве  $10^7$ - $10^{10}$  кл/г. Для получения препарата осуществляют раздельное культивирование штаммов бактерий, приготовление микробной ассоциации смешиванием культуральных жидкостей штаммов бактерий в соотношении 2:1:1:1, аэрозольное напыление смеси культуральных жидкостей на глауконитсодержащий носитель при подаче подогретого до 40 °С воздуха до достижения влажности в конечном биопрепарате 4%, причем используют фракцию носителя со средним диаметром частиц 600 мкм, подвергнутую термообработке при температуре 190 °С до остаточной влажности 4%.

Недостатками данного препарата является использование разных питательных сред для культивирования штаммов, а также многостадийная технология подготовки товарной формы биопрепарата, включающая термообработку.

Известен биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов (Патент РФ № 2361686, опубл.: 20.07.2009), включающий аэробные нефтеокисляющие микроорганизмы, минеральный питательный субстрат, нормальные парафины от C<sub>12</sub> до C<sub>18</sub> и твердый субстрат-носитель, отличающийся тем, что в качестве аэробных

нефтеоокисляющих микроорганизмов он содержит ассоциацию представителей 4-х родов и 8 видов: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Actinomyces griseus*, *Act. glaucus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. mesentericus*, *Ps. denitrificans*, *Arthrobacter globiformis*, выделенных из нефти Советского месторождения Западной Сибири в концентрации  $2,5 \cdot 10^9$  кл/г, в качестве субстрата-носителя содержит сферозолу и дополнительно содержит глюкозу при следующем соотношении компонентов, мас. %: минеральный питательный субстрат – 0,85-0,95; нормальные парафины  $C_{12}$ - $C_{18}$  – 0,6-0,7; глюкоза – 0,9-1,0; ассоциация аэробных нефтеоокисляющих микроорганизмов – 0,06-0,08; сферозола – до 100.

Недостатком данного изобретения является многокомпонентный состав биопрепарата, включающий 8 различных видов бактерий и большое количество вспомогательных веществ.

Известен микробный препарат для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами (Патент РФ № 2705290, опубл.: 06.11.2019), принятый за прототип, в качестве нефтеразрушающих микроорганизмов он содержит ассоциацию трех штаммов: *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2784D, *Acinetobacter guillouiae* В-3216D, *Acinetobacter guillouiae* В-3217D в виде смеси их равных объемов с содержанием каждого компонента не менее  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/мл, предварительно высушенных до влажности не более 10%.

Недостатком предложенного препарата является ограниченность его использования ввиду необходимости поддержания повышенной температуры  $25^\circ\text{C}$ , не характерной для большинства нефтезагрязненных территорий России, для снижения концентрации нефти на 70% в течение 60 суток. Также недостатком изобретения является применение трудоемкой операции по высушиванию в технологии получения препарата.

Техническим результатом является разработка состава для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с высокой степенью очистки.

Технический результат достигается тем, что в качестве штаммов используют *Acinetobacter* sp. ВКМ В-3202, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-858<sup>T</sup>, *Pseudomonas alcaligenes* ВКМ В-1295 в виде смеси бактериальных суспензий при следующих соотношениях, % по объему:

штамм <i>Acinetobacter</i> sp. ВКМ В-3202	25
штамм <i>Rhodococcus erythropolis</i> ВКМ Ас-858 <sup>T</sup>	25-50
штамм <i>Pseudomonas alcaligenes</i> ВКМ В-1295	50-25

Заявляемый состав для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами, включают в себя следующие штаммы в виде бактериальных суспензий, % по объему:

- Штамм *Acinetobacter* sp. депонирован в коллекции ФБГУН ВКМ г. Пущино под регистрационным номером ВКМ В-3202 – 25.

- Штамм *Rhodococcus erythropolis* депонирован в коллекции ФБГУН ВКМ г. Пущино под регистрационным номером ВКМ Ас-858<sup>T</sup> – 25-50.

- Штамм *Pseudomonas alcaligenes* депонирован в коллекции ФБГУН ВКМ г. Пущино под регистрационным номером ВКМ В-1295 – 25-50.

Культивирование штаммов осуществлялось на твердой питательной среде ГМФ-агар при температуре от  $26$  до  $30^\circ\text{C}$  в течение не менее 48 часов. Бактериальные суспензии получали методом смыва с поверхности питательных сред.

Концентрация клеток в полученных суспензиях определялась спектрофотометрическим методом по калибровочным зависимостям количества клеток

от оптической плотности для использованных штаммов и составляла не менее  $10^7$  КОЕ/мл суспензии.

Состав поясняется следующими примерами, а результаты экспериментов представлены в таблице 1.

5 Пример 1. Суспензии трех штаммов вносили в нефтезагрязненную почву, отобранную в районе ж/д станции Таммисуо, Ленинградская обл., г. Выборг. В контейнеры помещали по 200 г почвы, инокулировали бактериальными суспензиями с титром не менее  $10^7$  КОЕ/мл в пропорциях, согласно таблице 1, и тщательно перемешивали стерильным шпателем. В качестве контроля использовалась загрязненная почва без внесения  
10 бактериальных суспензий.

Пример 2. Суспензии трех штаммов вносили в почву, загрязненную в лабораторных условиях посредством внесения сырой нефти (5 мас. %). В контейнеры помещали по 200 г почвы, инокулировали бактериальными суспензиями с титром не менее  $10^7$  КОЕ/мл в пропорциях, согласно таблице 1, и тщательно перемешивали стерильным шпателем. В качестве контроля использовалась загрязненная почва без внесения бактериальных суспензий.

Пример 3. Суспензии трех штаммов вносили в почву, загрязненную в лабораторных условиях посредством внесения дизельного топлива (5 мас. %). В контейнеры помещали по 200 г почвы, инокулировали бактериальными суспензиями с титром не менее  $10^7$  КОЕ/мл в пропорциях, согласно таблице 1, и тщательно перемешивали стерильным шпателем. В качестве контроля использовалась загрязненная почва без внесения бактериальных суспензий.

Пример 4. Суспензии трех штаммов вносили в почву, загрязненную в лабораторных условиях посредством внесения бензина (5 мас. %). В контейнеры помещали по 200 г почвы, инокулировали бактериальными суспензиями с титром не менее  $10^7$  КОЕ/мл в пропорциях, согласно таблице 1, и тщательно перемешивали стерильным шпателем. В качестве контроля использовалась загрязненная почва без внесения бактериальных суспензий.

Инкубирование почвы проводили в течение 60 суток при температуре от 18 до 22°C, осуществляли поддержание естественной влажности почв от 40 до 60%.

Концентрация нефтепродуктов и нефти в образцах почвы определялась флуориметрическим методом перед внесением составов, а также на протяжении 60  
35 суток с временным интервалом не менее 14 суток.

Таблица 1 – Динамика концентрации нефтепродуктов и нефти в образцах почвы

Загрязнитель	Соотношение ВКМ В-3202/ ВКМ Ас-858 <sup>Т</sup> / ВКМ В-1295	Временной интервал от начала опыта, сут.			
		14	28	42	60
Нефтепродукт с разлива	25%/25%/50%	13,28	30,39	50,89	71,97
	25%/50%/25%	11,40	24,26	38,10	61,45
	20%/40%/40%	0,00	0,00	20,68	47,01
	20%/20%/60%	12,42	25,17	46,28	65,25
	20%/60%/20%	10,12	21,42	35,25	58,30
	30%/30%/40%	7,53	17,32	32,72	45,27
	30%/40%/30%	5,08	11,33	28,73	42,26
	10%/10%/80%	11,52	22,77	43,37	58,34
Нефть	10%/80%/10%	9,05	18,67	33,48	55,57
	25%/25%/50%	14,77	21,81	32,95	54,17
	25%/50%/25%	35,49	48,92	67,72	75,59

5		20%/40%/40%	8,18	40,97	54,52	68,60
		20%/20%/60%	12,36	18,82	28,75	50,33
		20%/60%/20%	30,25	44,64	61,23	70,53
		30%/30%/40%	8,73	13,42	26,25	42,83
		30%/40%/30%	15,37	34,92	49,52	60,44
		10%/10%/80%	10,40	15,22	24,70	46,45
		10%/80%/10%	18,55	38,27	54,12	65,56
10	Дизельное топливо	25%/25%/50%	23,32	79,37	84,01	86,43
		25%/50%/25%	37,26	88,42	88,79	90,53
		20%/40%/40%	13,50	74,11	80,16	85,07
		20%/20%/60%	20,64	69,35	78,07	83,53
		20%/60%/20%	30,36	65,54	81,13	87,56
		30%/30%/40%	15,93	48,73	60,45	71,33
		30%/40%/30%	20,65	52,05	69,40	75,47
		10%/10%/80%	18,15	55,35	68,45	73,03
15	Бензин	10%/80%/10%	22,04	51,32	65,35	76,66
		25%/25%/50%	26,16	48,53	0,00	0,00
		25%/50%/25%	39,40	59,35	0,00	0,00
		20%/40%/40%	12,24	65,81	0,00	0,00
		20%/20%/60%	23,63	44,57	51,25	0,00
		20%/60%/20%	28,45	40,17	47,09	0,00
		30%/30%/40%	18,27	45,63	0,00	0,00
		30%/40%/30%	15,08	56,15	0,00	0,00
		10%/10%/80%	18,03	39,77	42,13	0,00
20		10%/80%/10%	19,35	39,43	46,38	0,00

Было установлено, что наибольшей эффективностью в отношении очистки почв, отобранных с разлива, от нефтепродукта обладает состав с внесением бактериальных суспензий *Acinetobacter sp.* ВКМ В-3202, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-858<sup>T</sup>, *Pseudomonas alcaligenes* ВКМ В-1295 в соотношении 25%:25%:50% по объему – концентрация нефтепродукта в образцах снизилась на 71,97% за 60 суток.

Наибольшей эффективностью в отношении очистки почв, загрязненных сырой нефтью и дизельным топливом, обладает состав с внесением бактериальных суспензий *Acinetobacter sp.* ВКМ В-3202, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-858<sup>T</sup>, *Pseudomonas alcaligenes* ВКМ В-1295 в соотношении 25%:50%:25% по объему – концентрация нефти в образцах снизилась, соответственно, на 75,59% и 90,53% за 60 суток эксперимента.

Низкая эффективность состава в отношении очистки почв от бензина и отсутствие динамики концентрации спустя 28 дней опыта связано с быстрой испаряемостью данного загрязнителя.

Данный состав может быть использован при проведении биологического этапа рекультивации нефтезагрязненных земель с высокой степенью очистки, за счет совместного действия бактериальных суспензий.

#### (57) Формула изобретения

Состав для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами, содержащий ассоциацию трех штаммов в виде смеси с содержанием каждого компонента не менее  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/мл, отличающийся тем, что в качестве штаммов используют *Acinetobacter sp.* ВКМ В-3202, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-858<sup>T</sup>, *Pseudomonas alcaligenes* ВКМ В-1295 в виде смеси бактериальных суспензий при следующих соотношениях, % по объему:

штамм *Rhodococcus erythropolis* BKM Ac-858<sup>T</sup>  
штамм *Pseudomonas alcaligenes* BKM B-1295

25-50  
50-25

5

10

15

20

25

30

35

40

45