



(51) МПК

B09C 1/10 (2006.01)*B01J 20/16* (2006.01)*C09K 17/40* (2006.01)*C12N 11/14* (2006.01)*C12N 1/20* (2006.01)*C12R 1/07* (2006.01)*C12R 1/425* (2006.01)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2013155969/10, 17.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.12.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.12.2013

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2015 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 20.10.2015 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: KZ 17975 В, 15.02.2010. RU 2143947 С1,
10.01.2000. RU 2007102497 А, 27.07.2008.ТУЯКБАЕВА А.У. Изучение
нефтеокисляющей активности
углеводородоокисляющих микроорганизмов,
иммобилизованных на природные
минеральные носители // Биотехнология.
Теория и практика

Адрес для переписки:

117186, Москва, Севастопольский
проспект,47А,ООО "НИИ Транснефть"

(72) Автор(ы):

Ерофеевская Лариса Анатольевна (RU),
Глязнецова Юлия Станиславовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Транснефть-Восток" (ООО "Транснефть-
Восток") (RU),
Открытое акционерное общество
"Акционерная компания по транспорту
нефти "Транснефть" (ОАО "АК
"Транснефть") (RU),
Общество с ограниченной ответственностью
"Научно-исследовательский институт
транспорта нефти и нефтепродуктов
Транснефть" (ООО "НИИ Транснефть") (RU)**(54) БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ДЛЯ
КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ КРАЙНЕГО СЕВЕРА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии. Предложен биопрепарат для
биоремедиации нефтезагрязненных почв для
климатических условий Крайнего Севера.
Биопрепарат содержит твердый субстрат-
носитель и иммобилизованный на его
поверхности консорциум
углеводородоокисляющих микроорганизмов,
включающий штаммы *Bacillus vallismoris* ВКПМ
В-11017, *Exiguobacterium mexicanum* ВКПМ В-11011, *Serratia plymuthica* ВКМ В-2819D,
Rhodococcus sp. ВКМ Ас-2626D и минеральный
питательный субстрат для бактерий.
Преимуществом изобретения является высокая
степень очистки почв и грунтов от нефти и
нефтепродуктов (на 87-88%) в условиях
холодного климата Крайнего Севера за короткий
промежуток времени (60 суток). 3 з.п. ф-лы, 9
табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
B09C 1/10 (2006.01)
B01J 20/16 (2006.01)
C09K 17/40 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
C12R 1/425 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013155969/10, 17.12.2013

(24) Effective date for property rights:
17.12.2013

Priority:

(22) Date of filing: 17.12.2013

(43) Application published: 27.06.2015 Bull. № 18

(45) Date of publication: 20.10.2015 Bull. № 29

Mail address:

117186, Moskva, Sevastopol'skij prospekt, 47A, OOO
"NII Transneft"

(72) Inventor(s):

Erofeevskaja Larisa Anatol'evna (RU),
Gljaznetsova Julija Stanislavovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Transneft'-Vostok" (OOO "Transneft'-Vostok")
(RU),
Otkrytoe aktsionernoe obshchestvo
"Aktsionernaja kompanija po transportu nefi
"Transneft'" (OAO "AK "Transneft'") (RU),
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Nauchno-issledovatel'skij institut transporta
nefti i nefteproduktov Transneft'" (OOO "NII
Transneft'") (RU)(54) **BIOPREPARATION FOR BIOREMEDIATION OF OIL-CONTAMINATED SOILS FOR CLIMATIC CONDITIONS OF FAR NORTH**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: biopreparation is proposed for the bioremediation of oil-contaminated soils for the climatic conditions of the Far North. The biopreparation comprises a solid substrate-carrier and a consortium of hydrocarbon-oxidizing microorganisms immobilized on its surface, comprising strains of *Bacillus vallismoris* RNCIM B-11017, *Exiguobacterium mexicanum* RNCIM

B-11011, *Serratia plymuthica* VKM B-2819D, *Rhodococcus* sp. VKM Ac-2626D, and the mineral nutrient substrate for bacteria.

EFFECT: high degree of purification of soil and ground of oil and petroleum products under conditions of cold climate of the Far North in a short period of time.

4 cl, 9 tbl, 3 ex

Изобретение относится к микробиологической очистке мерзлотных почв от нефтяных загрязнений.

Проблема очистки почв от загрязнений нефтью является важной задачей защиты окружающей среды, поскольку процесс самовосстановления нефтезагрязненных почв является очень длительным и может продолжаться более 25 лет, а в районах Крайнего Севера до 50 и более лет.

Трудности реабилитации нарушенных экосистем в условиях вечной мерзлоты связаны с крайне низкой способностью почв к самоочищению.

Низкие температуры, застойное увлажнение, присутствие близко залегающей многолетней мерзлоты, слабое преобразование органической и минеральной частей, недостаток питательных веществ, короткий вегетационный период, низкая активность микробных популяций - все это отражается на морфологии и свойствах северных почв и сдерживает процессы естественного восстановления окружающей среды, загрязненной нефтяными углеводородами (УВ).

Интенсификация биодеградации углеводородов нефти в мерзлотных почвах может быть достигнута за счет внесения в загрязненную почву биопрепаратов, содержащих углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ).

Известен биопрепарат «Путидойл» (Дядечко, Толстокорова, Морозова. Патент SU 1076446, 1984), предназначенный для биологической очистке воды от нефти и нефтепродуктов. Его недостатком является сложная технология приготовления препарата, которая предусматривает распылительную сушку живой культуры бактерий, что вызывает травмирование бактерий и, как следствие, их гибель или потерю необходимой активности вследствие инактивации клеток под действием высоких температур (+60°C). Для восстановления жизнедеятельности бактерий авторы применяют сложный комплекс мер: подогрев большого количества воды (5 м³) от +18 до +28°C, перемешивание, аэрирование, и все это в течение длительного времени (16-24 ч), что в полевых условиях выполнить довольно сложно. Малоэффективность препарата «Путидойл» в естественных условиях подтверждена в публикациях (Новиков, Комзолова, 1992).

Известен способ очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, в котором в качестве биопрепарата используют консорциум нефтеокисляющих микроорганизмов *Pseudomonas putida* ПИ Ко-1, *Pseudomonas fluorescens* ПИ-896, *Micrococcus* sp. ПИ Ку-1, *Burkholderia caryophylli* Jap-3, *Serratia odorifera* Jap-1 при весовом соотношении 3-12 мас.% каждого микроорганизма, при этом совместно с суспензией биопрепарата в загрязненную среду вводят ризоторфин в количестве 30-120 г/м² (RU 2191643, В09С 1/10, 2001.07.09), где ризоторфин - земледобрильный препарат азотфиксирующих микроорганизмов.

Недостатком является то, что при приготовлении рабочей суспензии микроорганизмов температура поддерживается на уровне +18...+22°C, т.е. микроорганизмы, входящие в состав консорциума, не способны к деградации нефтепродуктов при пониженных положительных температурах (+4...+8°C).

Известен способ очистки почвы с использованием биопрепарата "Деворойл", содержащего консорциум углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Yarrowia lipolytica*. Этот способ предусматривает при хранении суспензии микроорганизмов использование NaCl, биологически активных веществ (витамины) и осмопротекторов (бетаин) (RU 2114071, С02F 3/34, 1997.05.22). Недостатком является то, что несмотря на добавление к бактериальной суспензии защитных веществ численность микроорганизмов снижается

независимо от температуры хранения.

Известен бактериальный препарат, состоящий из высокоактивных живых аэробных нефтеокисляющих бактерий (*Mycobacterium*, *Pseudomonas* и др.), выращенных на твердых субстратах-носителях с титрами 2,5-7,0-10⁹ кл./г. В качестве субстрата-носителя для иммобилизации микроорганизмов используют гамма-стерильный торф с рН 6,8-7,0 в количестве 40-45 мас.% и воду в количестве 58,95-53,25 мас.%. С целью поддержания нефтеокисляющей активности в процессе хранения в препарат дополнительно вводят питательные субстраты: аммоний щавелевокислый (0,05-1,0 мас.%) и нормальные парафины (1,0-1,5 мас.%). Срок годности биопрепарата - 6 месяцев при температуре +10...+15°C с момента его изготовления (RU 2053205, МПК C02F 3/34). Биопрепарат содержит нефтеокисляющие бактерии, для поддержания жизнедеятельности которых требуется рН среды 6.8-7.0 и большое количество воды (около 60% воды), что снижает его эффективность во времени.

Известен способ очистки почв и грунтов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с использованием олеофильного биопрепарата на основе ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов - *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 708 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 327 и биосурфактанта-*Rhodococcus*, отличающийся тем, что производят первоначальную обработку сильнозагрязненной почвы/грунта до достижения уровня остаточных нефтепродуктов 5-10 вес.% и последующее добавление органического разрыхлителя, олеофильный биопрепарат вносят в количестве не менее 10 л на 0,5-1,0 м³ почвы/грунта по меньшей мере один раз в неделю в течение первого месяца и в дальнейшем по меньшей мере один раз в месяц до окончания цикла биоремедиации в сочетании с периодическим рыхлением и увлажнением и дополнительно производят фиторемедиацию - засев многолетними травами (RU 2193464, В09С 1/10, 2001.11.14). Однако вышеописанный способ предполагает использование твердожидкофазного биореактора и/или аэрируемых почвенных площадок в качестве первоначальной обработки сильнозагрязненной почвы. Такой метод снижения уровня загрязнения трудоемок и предполагает нарушение плодородного слоя почвы (гумусированной части почвенного профиля), что не применимо при авариях и разливах нефти и нефтепродуктов в условиях Крайнего Севера (в том числе в зоне тундры). Поскольку обязательным условием очистки и восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв является сохранение плодородного слоя почвы. Это объясняется тем, что на месте снятия почвенного покрова в мерзлотных условиях возможно образование термокарстовой оттайки с образованием воронок, провалов или аласов, что в свою очередь приводит к развитию термоэрозии и наносит большой ущерб ранимой и трудно восстанавливаемой почвенной экосистеме Крайнего Севера.

Наиболее близким к предлагаемому техническому решению является «Способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis*» (RU 2446900, В09С 1/10 дата публикации 10.04.2012), согласно которому для очистки почвы от нефтяных загрязнений вносят микробный препарат на основе суспензии штамма бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма-7/2к». Применение такого микробного препарата позволяет за 3 месяца летнего периода снизить концентрацию нефти до 0,48%.

Одним из недостатков этого способа является неспособность входящего в микробный препарат штамма деградировать нефть при температурах наружного воздуха от +4 до +30°C.

Другим недостатком данного способа является получение только жидкой формы препарата, что сокращает сроки хранения биопрепарата и не всегда удобно при транспортировке препарата для устранения аварийных разливов нефтепродуктов в

труднодоступных местах (поросших растительностью, скалистых, овражистых и т.д.). Кроме того, в состав микробного препарата входит только один штамм бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма-7/2к», выращенный на мясопептонном агаре при pH 7,0-7,2, в течение 5 суток при температуре +37°C. Как известно биопрепараты, состоящие из двух и более штаммов микроорганизмов, более эффективно утилизируют нефтезагрязнения. Следует также подчеркнуть, что в процессе окисления нефти штаммам, хотя и принадлежит ведущая роль, однако практическое использование микробной дегградации нефти определяется составом биопрепарата, что определяет жизнеспособность бактерий, их количеством и технологией использования препаратов в практических целях.

Задачей изобретения является повышение эффективности биоремедиации в условиях короткого северного лета, ускорение процессов деструкции нефтепродуктов и сокращение сроков подготовки почв к самовосстановлению.

Технический результат заключается в снижении уровня нефтезагрязнения в различных типах мерзлотных почв на 87-88% за 60 суток.

Задача выполняется, а технический результат достигается созданием биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв для климатических условий Крайнего Севера.

Совокупность существенных признаков, обеспечивающих получение технического результата, приведена ниже.

Биопрепарат для биоремедиации нефтезагрязненных почв для климатических условий Крайнего Севера содержит твердый субстрат-носитель, иммобилизованный на его поверхность консорциум углеводородоокисляющих микроорганизмов, выступающих в качестве биодеструкторов, и минеральный питательный субстрат для микроорганизмов.

Биопрепарат в качестве нефтеструкторов содержит в равных соотношениях (1:1:1) консорциум углеводородоокисляющих микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^9 кл./см³, выделенных из мерзлотных почв и грунтов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, и включает:

- *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКГТМ В-11017
- *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011
- *Serratia plymuthica* ELA-9 VKM В-2819D
- *Rhodococcus* sp. LER-12 ВKM Ас-2626D.

Биопрепарат в качестве твердого субстрата-носителя содержит измельченный мелкозернистый минерал клиноптилолит-гейландитового ряда (цеолитизированный туф) фракцией 1-3 мм с содержанием цеолита 60...95% и с химическим составом SiO₂ 65,01-70,45%; TiO₂ 0,16-0,18%; Al₂O₃ 10,99-12,00%; Fe₂O₃ 0,70-0,99%; MnO 0-0,02%; MgO 0,77-3,76%; CaO 0,52-3,73%; SrO 0,14-0,24%; Na₂O 0,44-3,87%; K₂O 0,9-11,63%; H₂O 12,96-11,34%; P₂O₅ 0,01-0,21%.

Биопрепарат в качестве дополнительного минерального питательного субстрата для микроорганизмов содержит минеральные компоненты, в следующем соотношении (г), KNO₃ - 4,0; MgSO₄·7H₂O - 0,8; NaCl - 1,0; K₂ HPO₄ - 1,4; KH₂PO₄ - 0,6.

Природный цеолитизированный туф - каркасный аллюмосиликат, в структуре которого имеются сообщающиеся полости, занятые крупными ионами различных элементов и молекулами воды, имеющими значительную свободу движения, благодаря чему происходят ионный обмен и обратимая дегидратация. Кристаллическая решетка цеолитизированных туфов сформирована тетраидами с хорошо развитой внутренней поверхностью, что обеспечивает сорбционную способность минералу и хорошую

адгезию микробным клеткам, позволяя закрепляться нефтедеструкторам не только на поверхности носителя, но и внутри. Одному грамму цеолита соответствует внутренняя поверхность, равная 800 м^2 . Отсюда следует, что плотность цеолитов также мала и составляет $1,9-2,3 \text{ г/см}^3$.

Благодаря своему кристаллохимическому строению цеолиты биологически активны. Закрепление микроорганизмов внутри кристаллов цеолита позволяет им благополучно переносить воздействие прямых солнечных лучей и резких перепадов температур окружающей среды, а сорбционные и ионообменные свойства минерала обеспечивают микроорганизмы дополнительными источниками питания (углеводородами нефти и элементами минерального питания, сорбируемыми из почвы), необходимыми для метаболизма микробных клеток. Это обеспечивает высокоэффективность и пролонгированность реакций деструкции нефтепродуктов. Кроме того, сам цеолит выступает источником макро- и микроэлементов, необходимых для активации и питания нефтеокисляющих микроорганизмов почвы (таблица 1).

Таблица 1
Химический состав цеолитов различных месторождений

Месторождение	Содержание цеолита в породе, %	Состав, вес, %								
		SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	H ₂ O	Сумма
Пегасское (Кемеровская обл.)	64-68	61,96	12,05	3,47	1,42	4,16	0,30	0,95	14,97	99,77
Мухар-Тала (Бурятия)	-	62,12	12,57	1,12	0,57	2,39	1,23	2,19	14,66	100,24
Чугуевское (Приморье)	50-53	67,90	12,66	0,95	0,55	2,39	0,83	2,52	12,18	99,27
Шивыртуйское (Читинская обл.)	62-70	61,87	12,80	1,83	1,30	2,37	1,23	3,07	14,52	99,65
Холинское (Бурятия)	48-53	66,34	12,63	0,82	0,40	1,24	2,50	4,03	11,29	99,55
Хонгуруу (Якутия), 1 карьер	70-98	65,55	12,33	1,00	1,13	1,81	2,75	1,08	12,43	99,60
Хонгуруу (Якутия) 2 карьер	70-85	67,31	11,73	0,75	1,81	3,18	0,74	1,62	10,86	98,73

Являясь катализатором реакций деструкции нефтяных углеводородов, цеолит при внесении его в нефтезагрязненные почвы способствует и формированию в загрязненном грунте центров активной деструкции нефтяных углеводородов благодаря сорбции на его поверхности нефтеусваивающих культур микроорганизмов. При этом дополнительными характеристиками цеолита является: экологическая безопасность, широкая сырьевая база и сравнительно невысокая стоимость. На земном шаре открыто около 1000 крупных месторождений. Из них более 50 обнаружено в СНГ и более 20 в Сибири. Среди которых: Хонгуринское - в Якутии; Холинское и Шивыртуйское - в Читинской области; Пегасское - в Кемеровской области; Назаровское - в Красноярском крае; Раденское - в Еврейской автономной области; Чугуевское - на Дальнем Востоке и др. Только на месторождении Хонгуруу утверждены запасы 11462 тыс. тонн. По стоимости природные цеолиты в 20-200 раз дешевле субститутов.

Предложенное техническое решение выгодно, так как для своего осуществления не требует сложного технологического оборудования. А цеолит, служащий в данном способе носителем для микроорганизмов, является одновременно и доступным и

дешевым сырьем, поскольку цеолиты имеют поверхностное залегание и разрабатываются открытым способом.

Очистка почвы от нефтезагрязнений предлагаемым биопрепаратом на основе нефтеструктуров, иммобилизованных на цеолит, позволяет предотвратить распространение веществ-загрязнителей на сопряженные ландшафты, добиться устранения пятен загрязненного грунта, снизить токсичность почв и стимулировать появление естественного растительного покрова на загрязненных участках, что значительно улучшает санитарно-экологическое состояние нарушенной территории.

Предлагаемый биопрепарат для очистки почвы от нефтяных загрязнений является экологически безопасным, поскольку основой для его приготовления являются природные образования - природный цеолитизированный туф и непатогенный микроорганизмы, утилизирующие разлитую нефть. Отбор штаммов, входящих в состав биопрепарата, проводили на основании их способности к утилизации углеводов при культивировании в контакте с нефтью в широком диапазоне температур.

Характеристика штаммов:

1. *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКПМ В-11017

Штамм характеризуется следующими признаками:грамположительные споровые палочки, в мазках расположены одиночно и короткими цепочками.

На мясопептонном агаре (масс. %: ферментативный пептон - 1,0; натрий хлористый - 0,5; агар - 1,0; вода мясная - остальное, рН 7,0-7,2) с добавлением 1% глюкозы растет в виде сморщенных суховатых бежевых колоний, через 1-3 суток колонии окрашиваются в коричневый цвет, субстрат не пигментирует.

Штамм каталазоположителен, оксидазоотрицателен. Метаболизм окислительного типа. Биохимическая активность выражена слабо. Не усваивает лизин и орнитин. Не потребляет цитрат и малонат натрия. Желатин не гидролизует. Крахмал не разлагает. Индолаотрицателен. Не образует сероводород. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная. Фенилаланиндезоксиаминаза отрицательная. Ферментирует бета-галактозидазу.

Штамм хорошо растет при температуре от +8 до +37°C, в аэробных условиях. При температуре ниже +8°C и в анаэробных условиях штамм сразу не погибает, но развивается медленнее. Растет при рН 6,0-8,0. Растет в солевом бульоне с добавлением 0,1-2,0% NaCl.

Штамм *Bacillus vallismortis* ВКПМ В-11017 утилизирует нефть в качестве источника углерода. Процесс идет в широком диапазоне температур (+8...+37°C) (таблица 2).

1.1 Исследование нефтеокисляющей активности штамма бактерий *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКПМ В-11017

Клетки штамма *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКПМ В-11017 со скошенного МПА смывают 0,9% раствором NaCl, готовят исходную микробную суспензию бактериального изолята, объемом 25 см³, с концентрацией 1×10⁹ кл./см³ по оптическому стандарту ГИСК им. А.М. Тарасевича.

Полученный бактериальный изолят штамма *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКПМ В-11017 культивируют в жидкой минеральной среде Мюнца следующего состава (масс. %): KNO₃ - 0,4; MgSO₄·7H₂O - 0,08; NaCl - 0,1; K₂ HPO₄ - 0,14; KH₂ PO₄ - 0,06; агар - 2,0; вода дистиллированная - остальное; рН среды - 7,2.

В колбочки объемом 200,0 см³ вносят по 100,0 см³ готовой минеральной среды и 1000 мг нефти. Колбы засевают клетками штамма до концентрации 1·10⁹ кл./см³. В качестве контроля ставят такую же колбу со средой, нефтью и без бактерий для

определения общих (естественных) потерь. Опыт проводят в трех повторностях. Колбы культивируют в качалочных условиях на установке «УВМТ-12-250» при 200 об/мин, при температурах +8°C; +20°C; +30°C и +37°C в течение 7 суток.

Биодеградацию нефти и нефтепродуктов определяют спектрометрическим методом, с использованием концентратомера «ИКН-025» (ФР. 1.31.2007.03234).

Объективные данные, полученные в результате проведения эксперимента, показывают, что предлагаемый штамм уже на 7-е сутки при температуре +8°C утилизирует 18,5% - нефти; при температуре +20°C - 57,5%, при температуре +30°C - 60,7%, при температуре +37°C 52,8% (таблица 2).

Вариант	Среднеарифметическое содержание нефти, мг/дм ³			
	+8	+20	+30	+37
до опыта	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
после опыта	814,1	425,0	393,0	471,8
% деструкции	18,5	57,5	60,7	52,8

Таким образом, преимуществом штамма *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКПМ В-11017 является то, что он обладает высокой утилизирующей способностью по отношению к нефти, действует в широком диапазоне температур от +8 до +37°C и может быть использован для очистки субстратов от нефтяных загрязнений.

Штамм не вирулентный, не токсичный, не токсигенный, не фитотоксичен (проверка проведена на белых мышах и семенах высших растений (овес сорт «Скакун» и пшеница сорт «Приленская-19»).

Условия хранения:

1. В лиофилизированном виде в ампулах при +4°C.
2. Штамм может поддерживаться регулярными пересевами (1 раз в 2 недели) на скошенном МПА.

Штамм депонирован Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов в ФГУП ГосНИИГенетика - ВКПМ, 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1. Коллекционный номер ВКПМ В-11017.

2. *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011

Штамм характеризуется следующими признаками:грамположительные палочки, размером 0,8-1,0 мкм. Подвижные, с перитрихально расположенными жгутиками. В мазках располагаются скоплениями и попарно. Способны развиваться в анаэробных условиях. Спор и капсул не образуют.

На мясопептонном агаре (масс. %: ферментативный пептон - 1,0; натрий хлористый - 0,5; агар - 1,0; вода мясная - остальное, рН 7,0-7,2) формируют влажные, грязно-желтого цвета колонии округлой формы. Через 1-2 суток рельеф колоний изменяется. Колонии становятся суховатыми, края неровные.

Штамм каталаза положителен, оксидаза отрицателен. Метаболизм окислительного типа. Биохимическая активность выражена слабо. Не усваивает многоатомные спирты. Слабо ферментирует глюкозу и сахарозу, другие углеводы не ферментирует. Не усваивает лизин и орнитин. Не потребляет цитрат и малонат натрия. Желатин не гидролизует. Крахмал не разлагает. Индол отрицателен. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная. Фенилаланиндезоксаминаза отрицательная. Ферментирует бета-галактозидазу.

Штамм растет при температуре от +4 до +37°C, лучше в аэробных условиях. В анаэробных условиях штамм сразу не погибает, но развивается медленнее. Растет при

pH 6,0-8,0. Растет в солевом бульоне с добавлением 0,1-2,0% NaCl.

Штамм *Exiguobacterium mexicanum* ВКПМ В-11011 утилизирует нефть в качестве источника углерода. Процесс идет в широком диапазоне температур (+4...+37°C) (таблица 3).

5 2.1 Исследование нефтеокисляющей активности штамма *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011

Клетки штамма *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011 со скошенного МПА смывают 0,9% раствором NaCl, готовят исходную микробную суспензию бактериального изолята, объемом 25 см³, с концентрацией 1×10⁹ микробных кл./см³ по оптическому стандарту ГИСК им. А.М. Тарасевича.

Бактериальный изолят штамма культивируют в жидкой минеральной среде Мюнца.

В колбочки объемом 200,0 см³ вносят по 100,0 см³ готовой минеральной среды и 1000 мг нефти. Колбы засевают клетками штамма до концентрации 1·10⁹ клеток/см³. В качестве контроля ставят такую же колбу со средой, нефтью и без бактерий для определения общих (естественных) потерь. Опыт проводят в трех повторностях. Колбы культивируют при температурах +4°C; +20°C; +30°C и +37°C в течение 7 суток.

Биодеградацию нефти и нефтепродуктов определяют спектрометрическим методом, с использованием концентратомера «ИКН-025» (ФР. 1.31.2007.03234).

20 Объективные данные, полученные в результате проведения эксперимента, показывают, что предлагаемый штамм уже на 7-е сутки при температуре +4°C утилизирует 6,3% - нефти; при температуре +20°C - 49,7%, при температуре +30°C - 51,9%, при температуре +37°C - 57,7% нефти (таблица 3).

25 Таблица 3
Степень утилизации нефти штаммом *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011 через 7 суток культивирования

Вариант	Среднеарифметическое содержание нефти, мг/дм ³			
	+4	+20	+30	+37
t°C				
до опыта	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
после опыта	936,2	502,4	481,0	422,2
% деструкции	6,3	49,7	51,9	57,7

30

Таким образом, преимуществом штамма *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011 является то, что он обладает высокой утилизирующей способностью по отношению к нефти, действует в широком диапазоне температур от +4 до +37°C и может быть использован для очистки субстратов от нефтяных загрязнений.

35 Штамм не вирулентный, не токсичный, не токсигенный, не фитотоксичен (проверка проведена на белых мышах и семенах высших растений (овес сорт «Скакун» и пшеница сорт «Приленская-19»).

Условия хранения:

1. В лиофилизированном виде в ампулах при +4°C.
2. Штамм может поддерживаться регулярными пересевами (1 раз в месяц) на скошенном МГЛА.

Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ Генетика (ВКПМ) (Москва, 1-й Дорожный пр., д.1) под регистрационным номером ВКПМ В-11011.

45 3. Характеристика штамма *Rhodococcus* sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D

Штамм *Rhodococcus* sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D характеризуется следующими морфологическими свойствами: грамположительные крупные палочки, в мазках расположены одиночно и небольшими скоплениями. Штамм растет при температуре

+4...+30°C в аэробных условиях и слабо в анаэробных условиях. Оптимум роста +4...+20°C. Использует в качестве источника энергии углеводороды нефти и нефтепродуктов.

На МПА и ГРМ-агаре (на основе гидролизата рыбной муки) формирует крупные сметанообразные колонии, кремового цвета, диаметром до 5 мм и более. Консистенция мягкая, легко снимаются с поверхности агара, легко размазываются. На среде Сабуро формирует кремовые блестящие слизистые колонии. На агаризованной среде Мюнца с нефтью растет в виде кремовых выпуклых колоний диаметром 1-2 мм и более. В мясопептонном бульоне образуют муть с обильным слизистым осадком.

Штамм оксидаза отрицателен. Биохимическая активность выражена слабо.

Ферментирует сорбит. Не ферментирует глюкозу, лактозу, сахарозу и другие углеводы. Не усваивает лизин. Усваивает орнитин. Не потребляет цитрат и малонат натрия. Желатин не гидролизует. Крахмал не разлагает. Индол отрицателен. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная. Фенилаланиндезоксаминаза отрицательная. Не ферментирует бета--галактозидазу.

3.1 Исследование нефтеокисляющей активности штамма *Rhodococcus* sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D

Клетки штамма *Rhodococcus* sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D со скошенного МПА смывают 0,9% раствором NaCl, готовят исходную микробную суспензию бактериального изолята, объемом 25 см³, с концентрацией 1×10⁹ микробных клеток/см³ по оптическому стандарту ГИСК им. А.М. Тарасевича.

Бактериальный изолят штамма культивируют в жидкой минеральной среде Мюнца.

В колбочки объемом 200,0 см³ вносят по 100,0 см³ готовой минеральной среды и 1000 мг нефти. Колбы засевают клетками штамма до концентрации 1·10⁹ кл./см³. В качестве контроля ставят такую же колбу со средой, нефтью и без бактерий для определения общих (естественных) потерь. Опыт проводят в трех повторностях. Колбы культивируют при температурах +4°C; +20°C; +30°C и +37°C в течение 7 суток.

Биодеградацию нефти и нефтепродуктов определяют спектрометрическим методом, с использованием концентратомера «ИКН-025» (ФР. 1.31.2007.03234).

Объективные данные, полученные в результате проведения эксперимента, показывают, что предлагаемый штамм уже на 7-е сутки при температуре +4°C утилизирует 14,8% - нефти; при температуре +20°C - 96,5%, при температуре +30°C - 71,9%, при температуре +37°C - 55,7% нефти (таблица 4).

Таблица 4				
Степень утилизации нефти штаммом <i>Rhodococcus</i> sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D через 7 суток культивирования				
Вариант	Среднеарифметическое содержание нефти, мг/дм ³			
	+4	+20	+30	+37
до опыта	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
после опыта	852,0	35,0	281,0	443,0
% деструкции	14,8	96,5	71,9	55,7

Таким образом, преимуществом штамма *Rhodococcus* sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D является то, что он является психрофильным штаммом, способен к росту и развитию при оптимальных температурах +4...+20°C, обладает утилизирующей способностью по отношению к нефти и может быть использован для очистки почв от нефтяных загрязнений в почвенно-климатических условиях Крайнего Севера.

Штамм не вирулентный, не токсичный, не токсигенный, не фитотоксичен (проверка проведена на белых мышах и семенах высших растений (овес сорт «Скакун» и пшеница сорт «Приленская-19»).

Условия хранения:

1. В лиофилизированном виде в ампулах при +4°C.
2. Штамм может поддерживаться регулярными пересевами (1 раз в месяц) на скошенном МПА.

5 Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ИБФМ РАН (ВКМ) (г. Пущино, Московская обл., пр. Науки, дом 5) под регистрационным номером ВКМ Ас-2626D.

4. Характеристика штамма *Serratia plymuthica* ELA-9 VKM B-2819D

10 Штамм *Serratia plymuthica* ELA-9 VKM B-2819D характеризуется следующими морфолого-культуральными признаками: граммотрицательные палочки, в мазках расположены одиночно, беспорядочно или короткими цепочками. Штамм растет при температуре +4...+30°C с оптимумом +4...+15°C в аэробных условиях. На мясопептонном агаре формирует влажные красно-оранжевые колонии средних размеров. На поверхности скошенного МПА растет в виде маслянистого налета красно-оранжевого
15 цвета. В мясопептонном бульоне образует равномерную муть с диффузированием пигмента в бульон. На минеральной среде Мюнца с нефтью растет в виде пастообразных колоний малиново-красного цвета.

Штамм оксидаза положительный. Уреаза положительный. Биохимическая активность выражена слабо. Ферментирует сорбит и инозит. Не ферментирует глюкозу, лактозу,
20 сахарозу и другие углеводы. Не усваивает лизин и орнитин. Не потребляет цитрат и малонат натрия. Желатин не гидролизует. Крахмал не разлагает. Индол отрицателен. Реакция Фогес - Проскауэра отрицательная. Фенилаланиндезоксаминаза отрицательная. Ферментирует бета-- галактозидазу.

4.1 Исследование нефтеокисляющей активности штамма *Serratia plymuthica* ELA-9 VKM B-2819D

25 Клетки штамма *Serratia plymuthica* ELA-9 VKM B-2819D со скошенного МПА смывают 0,9% раствором NaCl, готовят исходную микробную суспензию бактериального изолята, объемом 25 см³, с концентрацией 1×10⁹ микробных кл./см³ по оптическому стандарту ГИСК им. А.М. Тарасевича.

30 Бактериальный изолят штамма культивируют в жидкой минеральной среде Мюнца.

В колбочки объемом 200,0 см³ вносят по 100,0 см³ готовой минеральной среды и 1000 мг нефти. Колбы засевают клетками штамма до концентрации 1·10⁹ кл./см³. В качестве контроля ставят такую же колбу со средой, нефтью и без бактерий для
35 определения общих (естественных) потерь. Опыт проводят в трех повторностях. Колбы культивируют при температурах +4°C; +20°C; +30°C и +37°C в течение 7 суток.

Биодеградацию нефти и нефтепродуктов определяют спектрометрическим методом, с использованием концентратомера «ИКН-025» (ФР. 1.31.2007.03234).

40 Объективные данные, полученные в результате проведения эксперимента, показывают, что предлагаемый штамм уже на 7-е сутки при температуре +4°C утилизирует 18,2% - нефти; при температуре +20°C - 76,3%, при температуре +30°C - 28,9%, при температуре +37°C - 6,2% нефти (таблица 5).

Таблица 5

Степень утилизации нефти штаммом *Serratia plymuthica* ELA-9 VKM B-2819D через 7 суток культивирования

Вариант	Среднеарифметическое содержание нефти, мг/дм ³			
	+4	+20	+30	+37
до опыта	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
после опыта	818,0	237,0	711,0	938,0

% деструкции	18,2	76,3	28,9	6,2
--------------	------	------	------	-----

Таким образом, преимуществом штамма *Serratia plymuthica* ELA-9 VKM B-2819D является то, что он является психрофильным штаммом, способен к росту и развитию при оптимальных температурах +4...+15°C, обладает утилизирующей способностью по отношению к нефти и может быть использован для очистки почв от нефтяных загрязнений в почвенно-климатических условиях Крайнего Севера.

Штамм не вирулентный, не токсичный, не токсигенный, не фитотоксичен (проверка проведена на белых мышах и семенах высших растений (овес сорт «Скакун» и пшеница сорт «Приленская-19»).

Условия хранения:

1. В лиофилизированном виде в ампулах при +4°C.
2. Штамм может поддерживаться регулярными пересевами (1 раз в месяц) на скошенном МПА.

Штамм депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов ИБФМ РАН (VKM) (г. Пушкино, Московская обл., пр. Науки, дом 5) под регистрационным номером VKM B-2819D.

Технология приготовления «Биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв для климатических условий Крайнего Севера»

- Получение маточной культуры

Для получения маточных культур используют агаровые культуры рабочей коллекции УОМ. Эти культуры являются посевным материалом, используемым для засева в ферментеры.

Для каждого бактериального изолята, являющегося на данном этапе производственным штаммом, готовят отдельный посевной материал и проводят культивирование в отдельном ферментере. При этом учитываются индивидуальные видовые и штаммовые особенности бактериального деструктора. Для получения маточной культуры используют минеральную среду следующего состава (масс.%): KNO₃ - 0,4; MgSO₄·7H₂O - 0,08; NaCl - 0,1; K₂HPO₄ - 0,14; KH₂PO₄ - 0,06; агар - 2,0; вода дистиллированная - остальное; pH среды - 7,2. Объем посевного материала должен составлять 5-10% от объема питательной среды.

Культуры изолятов, выращенные на скошенном ГРМ-агаре, основой которого является гидролизат рыбной муки, либо мясопептонный агар (МПА) промышленного производства, смывают физиологическим раствором, готовят суспензию. Концентрация клеток в суспензии должна составлять не менее 1×10⁹ кл./см³ по оптическому стандарту ГИСК им. А.М. Тарасевича; объем - не менее 25-50 см³.

- Культивирование посевного материала в колбах

Питательную минеральную среду того же состава разливают по 150 см³ в колбы вместимостью 500 см³, в среду засевают 15-25 см³ бактериальной суспензии, приготовленной методом смыва. Туда же вносят 1,5 см³ стерильной нефти. Посевы в колбах инкубируют в УВМТ в течение 72 часов при 200-220 об/мин, температуре выращивания 29±1°C.

- Получение посевного материала для иммобилизации

Выращивание бактерий, составляющих основу препарата, проводят на той же среде; в качестве единственного источника углерода используют стерильную сырую нефть, концентрация углеводородсодержащих продуктов в ферментационной жидкости составляет не менее 1% (по объему). Процесс ферментации осуществляют при

интенсивном перемешивании при температуре $29 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 36-48 часов.

По окончании процесса культивирования наработанную жидкость сливают в стерильные емкости и используют для иммобилизации сорбента-носителя.

- Иммобилизация штаммов на сорбент-носитель

5 Посевной материал для иммобилизации смешивают в аппарате с мешалкой с цеолитовой крошкой фракции 1-3 мм, в соотношении 1:10 (1 часть суспензии УОМ на 10 частей цеолитового сырья). После пропитки цеолита посевным материалом для иммобилизации его высушивают контактным способом при температуре 37°C до постоянной массы или при комнатной температуре в течение 2-х суток. Биопрепарат 10 готов к использованию. Сухой биопрепарат помещают в кеги или полиэтиленовые мешки и запаивают.

Параметры и характеристики биопрепарата должны соответствовать значениям таблицы 6.

15 Таблица 6 Биологические и физико-химические свойства «Биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв для климатических условий Крайнего Севера»		
Наименование показателя	Норма	Метод испытания
1. Внешний вид, цвет	мелкозернистая крошка светло-зеленого цвета	визуальный
2. Насыпная плотность (по сорбенту-носителю), г/см ³ *	от 2,0 до 2,43	ГОСТ 16190
3. Фракционный состав, содержание частиц, % - менее 1 мм; - более 3 мм	не более 5 0	ГОСТ 16187
4. pH водной вытяжки препарата (усл. ед.)	7,0...8,0	ГОСТ 17.5.4.01
5. Массовая доля влаги (воды), %, не более	5	ГОСТ 10898.1 ГОСТ 11305
6. Удельная поверхность S _{БЭТ} , м ² /г	не менее 15	ГОСТ 10898.5
7. Содержание, не менее - сорбента-носителя, %; - живых УОМ, кл./см ³ ; - бактерий группы кишечной палочки (колиформных), кл./см ³ ; - коагулазоположительных стафилококков, кл./см ³ ; - патогенных рода Salmonella, кл./см ³ ; - посторонней микрофлоры, кл.	85 10·10 ⁹ отсутствие** отсутствие** отсутствие** не более 10 в поле зрения микроскопа при увеличении в 1350 раз	ГОСТ Р 52816 ГОСТ Р 52815 ГОСТ Р 52814
11. Пористость носителя - сорбента, %, не менее	7,0	ГОСТ Р 52129
12. Нефтеокисляющая эффективность препарата, %, не менее	50	РД 39-0147098-015 РД 52.18.647 ГОСТ 17.4.3.03
Примечания: 1 *Показатель не является браковочным. 2 **Исследуются при необходимости подтверждения бактериальной чистоты препарата.		

Использование биопрепарата на основе консорциума штаммов 40 углеводородокисляющих микроорганизмов: *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКПМ В-11017; *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011; *Serratia plymuthica* ELA-9 ВКМ В-2819D; *Rhodococcus* sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D, взятых в равных пропорция (1:1:1) и иммобилизованных на сорбент-носитель (цеолит) в соотношении 1:10 (1 часть бактериальной суспензии консорциума микроорганизмов на 10 частей цеолита) для 45 очистки почв от нефтезагрязнений подтверждается примерами.

Примеры реализации изобретения

Пример 1. Очистка биопрепаратом мерзлотной болотистой почвы

Концентрация нефти в мерзлотной болотистой почве до внесения биопрепарата

составила 108338 мг/кг. Препарат вносили в концентрации 200 г на 1 кв.м, при глубине загрязнения 20 см. На протяжении эксперимента (60 суток) определяли динамику численности микроорганизмов, максимум которых в нефтезагрязненной почве увеличился после внесения биопрепарата на 3 порядка с $5,2 \cdot 10^4$ до $3,3 \cdot 10^7$ кл./г. Динамика

роста численности микроорганизмов согласуется с их деструктивной активностью. Эффективность биодegradации нефти биопрепаратом оценивали гравиметрическим методом (РД 39-0147098-90, 1990). Содержание нефти в почве после внесения биопрепарата составила 12304 мг/кг. Таким образом, биодegradация нефти в мерзлотной болотистой почве за 60 суток составила 88,64%. В контрольном участке, не обработанном биопрепаратом в процессе естественного окисления, деструкция нефтезагрязнения за тот же промежуток времени составила 7,32% (таблица 7).

Вариант опыта	Содержание нефти, мг/кг		Деструкция нефти за 60 суток, %
	до внесения биопрепарата	через 60 суток после внесения биопрепарата	
Почва+нефть+биопрепарат	108338	12304	88,64
Контроль (почва+нефть)	13771	12762	7,32

Пример 2. Очистка биопрепаратом мерзлотно-таежной почвы

Концентрация нефти в мерзлотно-таежной почве до внесения биопрепарата составила 16260 мг/кг. Препарат вносили в концентрации 200 г на 1 кв.м, при глубине загрязнения 20 см. На протяжении эксперимента (60 суток) определяли динамику численности микроорганизмов, максимум которых в нефтезагрязненной почве увеличился после внесения биопрепарата на 4 порядка с $4,5 \cdot 10^3$ до $4,7 \cdot 10^7$ кл./г. Динамика роста численности микроорганизмов согласуется с их деструктивной активностью.

Эффективность биодegradации нефти биопрепаратом оценивают гравиметрическим методом (РД 39-0147098-90, 1990). Содержание нефти в почве после внесения биопрепарата составила 2045 мг/кг. Таким образом, биодegradация нефти в мерзлотно-таежной почве за 60 суток составила 87,42%. В контрольном участке, не обработанном биопрепаратом в процессе естественного окисления, деструкция нефтезагрязнения за тот же промежуток времени составила 25,29% (таблица 8).

Вариант опыта	Содержание нефти, мг/кг		Деструкция нефти за 60 суток, %
	до внесения биопрепарата	через 60 суток после внесения биопрепарата	
Почва+нефть+биопрепарат	16260	2045	87,42
Контроль (почва+нефть)	34391	25692	25,29

Пример 3. Очистка биопрепаратом мерзлотно-торфяной почвы

Концентрация нефти в торфяной почве до внесения биопрепарата составила 13588 мг/кг.

Препарат вносили в концентрации 200 г на 1 куб.м. Препарат вносили в концентрации 200 г на 1 кв.м при глубине загрязнения 20 см. На протяжении эксперимента (60 суток) определяли динамику численности микроорганизмов, максимум которых в нефтезагрязненной почве увеличился после внесения биопрепарата на 4 порядка с $2,18 \cdot 10^5$ до $33,0 \cdot 10^9$ кл./г. Динамика роста согласуется с деструктивной активностью микроорганизмов. Эффективность биодegradации нефти биопрепаратом оценивают

гравиметрическим методом (РД 39-0147098-90, 1990). Содержание нефти в почве после внесения биопрепарата составила 7391 мг/кг. Таким образом, биодеградация нефти в мерзлотно-торфяной почве за 60 суток составила 88,64%. В контрольном участке, не обработанном биопрепаратом в процессе естественного окисления, деструкция нефтезагрязнения за тот же промежуток времени составила 2,15% (таблица 9).

Таблица 9			
Динамика деструкции нефти в мерзлотно-торфяной почве			
Вариант опыта	Содержание нефти, мг/кг		Деструкция нефти за 60 суток, %
	до внесения биопрепарата	через 60 суток после внесения биопрепарата	
Почва+нефть+биопрепарат	13588	7391	88,64
Контроль (почва+нефть)	99049	96918	2,15

Таким образом, результаты экспериментов показывают, что применение предлагаемого биопрепарата через 60 суток снижает уровень нефтезагрязнения в различных типах мерзлотных почв на 87-88%.

Преимуществом предлагаемого «Биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв для климатических условий Крайнего Севера» является то, что он благодаря совокупности уникальных свойств субстрата-носителя (цеолитизированного туфа) и иммобилизованным на его поверхности штаммов-нефтедеструкторов в составе: *Bacillus vallismortis* ELA-4 ВКПМ В-11017, *Exiguobacterium mexicanum* ELA-5 ВКПМ В-11011, *Serratia plymuthica* ELA-9 ВКМ В-2819D, *Rhodococcus* sp. LER-12 ВКМ Ас-2626D обладает способностью в сравнительно короткий промежуток времени (60 суток) снижать уровень нефтезагрязнения в различных типах мерзлотных почв на 87-88%.

Кроме того, большая удельная поверхность, высокая твердость, свободная сыпучесть субстрата-носителя способствуют структурированию нефтезагрязненной почвы, повышают доступ кислорода для почвенной микрофлоры, способствуют формированию в загрязненной почве центров активной деструкции нефтяных углеводородов.

Минеральные компоненты субстрата-носителя и субстрата для микроорганизмов служат источниками макро- и микроэлементов, необходимых для активизации нефтеокисляющих и азотфиксирующих микроорганизмов мерзлотной почвы, что приводит к пролангированию активности полезной микрофлоры в условиях короткого вегетационного периода и к сокращению сроков самовосстановления нарушенной экосистемы, позволяет значительно сократить расход минеральных удобрений при проведении мероприятий по биоремедиации нефтезагрязненных почв в условиях Крайнего Севера.

Таким образом, применение предлагаемого биопрепарата позволяет за короткий срок (60 суток) добиться высокой степени очистки почв и грунтов от нефти и нефтепродуктов в условиях холодного климата Крайнего Севера без передвижения почвенного слоя на 87-88%.

Формула изобретения

1. Биопрепарат для биоремедиации нефтезагрязненных почв для климатических условий Крайнего Севера, отличающийся тем, что содержит твердый субстрат-носитель и иммобилизованный на его поверхности консорциум углеводородокисляющих микроорганизмов, выступающих в качестве биодеструкторов - штаммов *Bacillus vallismortis* ВКПМ В-11017, *Exiguobacterium mexicanum* ВКПМ В-11011, *Serratia plymuthica* ВКМ В-2819D, *Rhodococcus* sp. ВКМ Ас-2626D, и минеральный питательный субстрат для бактерий.

2. Биопрепарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве нефтеструкторов содержит в равных соотношениях консорциум углеводородоокисляющих микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^9 кл./см³, выделенных из мерзлотных почв и грунтов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

5 3. Биопрепарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве носителя для углеводородоокисляющих микроорганизмов применяется природный цеолит, сочетающий в себе свойства носителя для микроорганизмов и сорбента для нефти, с возможностью продления деструкции нефтяных углеводородов.

10 4. Биопрепарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве дополнительного минерального питательного субстрата для бактерий содержит минеральные компоненты в следующем соотношении (г), KNO₃ - 4,0; MgSO₄·7H₂O - 0,8; NaCl - 1,0; K₂ HPO₄ - 1,4; KН₂ PO₄ - 0,6.

15

20

25

30

35

40

45