



(51) МПК

*C02F 3/34* (2006.01)*C12N 1/26* (2006.01)*C12R 1/77* (2006.01)*C12R 1/645* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005124814/13, 03.08.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
03.08.2005

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2007

(45) Опубликовано: 20.05.2007 Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2053205 C1, 27.01.1996. RU 2198748 C1, 20.02.2003. US 4415661, 15.11.1983. ЯГАФАРОВА Г.Г. и др. Биоочистка почвы и воды от нефти и синтетических жирных кислот. Актуальные вопросы прикладной биохимии и биотехнологии. Материалы конференции биохимиков Урала и Западной Сибири. - Уфа, 1998, с.267-270. КОРОНЕЛЛИ Т.В. Принципы и методы интенсификации (см. прод.)

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая,  
28, Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, пат.  
пов. Л.Б. Печерской

(72) Автор(ы):

Хабибуллина Флюза Мубаракновна (RU),  
Арчегова Инна Борисовна (RU),  
Ибатуллина Инна Зайтуновна (RU),  
Таскаев Анатолий Иванович (RU),  
Тулянкин Геннадий Михайлович (RU),  
Жучихин Юрий Сергеевич (RU),  
Козьминых Анатолий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения Российской академии  
наук (RU)

## (54) БИОСОРБЕНТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к нефтяной промышленности и экологии и может быть использовано для очистки водной поверхности от нефти и нефтепродуктов. Биосорбент содержит гидрофобный сорбент нефти на основе торфа и биомассу штаммов микромицета *Fusarium lateritium* НК-204 или *Gliocladium deliquescens* НК-205 или *Gliocladium deliquescens* НК-206 или консорциума

этих штаммов, иммобилизованных в гидрофобный сорбент нефти посредством обрастания сорбента грибами. Изобретение позволяет осуществлять одновременно сорбцию и утилизацию нефти и нефтепродуктов с водной поверхности и характеризуется высокой биодеструкционной активностью при ликвидации интенсивных загрязнений в возрасте более 3 месяцев.

(56) (продолжение):

биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор). Прикладная биохимия и микробиология, 1996, том. 32, №6, 579-585. БЕЛЬКЕВИЧ П.И. Гранулированный торф для очистки сточных вод от нефти и нефтепродуктов. - Торфяная промышленность, №10, 1984, 15-17.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C02F 3/34* (2006.01)*C12N 1/26* (2006.01)*C12R 1/77* (2006.01)*C12R 1/645* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005124814/13, 03.08.2005**(24) Effective date for property rights: **03.08.2005**(43) Application published: **10.02.2007**(45) Date of publication: **20.05.2007 Bull. 14**

Mail address:

**167982, g. Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja,  
28, Institut biologii Komi NTs UrO RAN, pat.  
pov. L.B. Pecherskoj**

(72) Inventor(s):

**Khabibullina Fljuza Mubarakovna (RU),  
Arhegova Inna Borisovna (RU),  
Ibatullina Inna Zajtunovna (RU),  
Taskaev Anatolij Ivanovich (RU),  
Tuljankin Gennadij Mikhajlovich (RU),  
Zhuchikhin Jurij Sergeevich (RU),  
Koz'minykh Anatolij Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra  
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (RU)**

(54) **BIOSORBENT FOR REMOVING CRUDE OIL AND PETROLEUM PRODUCTS FROM WATER SURFACE**

(57) Abstract:

FIELD: biological oil pollution elimination.

SUBSTANCE: biosorbent contains peat-based hydrophobic oil sorbent and biomass composed of micromycet strains *Fusarium lateritum* NK-204 or *Gliocladium deliquescens* NK-205, or *Gliocladium deliquescens* NK-206, or consortium of these

species immobilized in hydrophobic oil sorbent by means of fungi grown on the sorbent.

EFFECT: enabled simultaneous sorption and utilization of crude oil and petroleum products and enhanced biologically destructional activity in elimination of strong pollution aged more than 3 months.

Изобретение относится к нефтяной промышленности и экологии и может быть использовано для очистки поверхности природных и искусственных водоемов, сточных вод и жидких отходов производств от загрязнений нефтью и нефтепродуктами с одновременной утилизацией загрязнения микроорганизмами.

5 Известны гидрофобные сорбенты на основе торфа (патенты РФ №2116128, №2191067, №2201898, заявка 2003127857. Все гидрофобные сорбенты характеризуются высокой нефтеемкостью и плавучестью.

Известен гидрофобный органоминеральный нефтяной сорбент "СОРБОНАФТ" (ТУ 0392-001-55763877-2003). Сорбент получен по способу, описанному в патенте РФ №2214859.

10 Максимальная поглотительная способность сорбента составляет 650%, крупность частиц сыпного сорбента 0,2-3,0 мм.

Недостатком этого сорбента является то, что собранную с поверхности воды нефть необходимо либо отделять от сорбента, что требует дополнительных затрат, или утилизировать сорбент вместе с нефтью.

15 Известен сорбент НАФТОКС для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов (патент РФ №2053205), выбранный нами за прототип, включающий аэробные нефтеокисляющие бактерии, взятые в эффективном количестве, и наполнитель в виде органического или минерального твердого субстрата, например торфа, дерновоподзолистой почвы, чернозема, торфяно-навозного компоста.

20 Недостатком этого биопрепарата является то, что применяемый субстрат не обладает гидрофобностью на глади воды и не имеет достаточной поглотительной способности нефти и нефтепродуктов.

Задачей изобретения является получение нового биосорбента, способного осуществлять одновременно сорбцию и утилизацию нефти и нефтепродуктов с водной 25 поверхности за счет применения штаммов микромицетов или их консорциума, способных к иммобилизации к гидрофобному сорбенту и характеризующихся высокой биодеструкционной активностью при ликвидации интенсивных загрязнений в возрасте более 3 месяцев.

В этом состоит технический результат.

30 Результат достигается тем, что биосорбент для очистки водной поверхности от нефти и нефтепродуктов включает нефтеокисляющие микроорганизмы, взятые в эффективном количестве и носитель на основе торфа, отличается тем, что в качестве носителя содержит гидрофобный нефтяной сорбент, в качестве нефтеокисляющих микроорганизмов - штамм микромицета: *Fusarium lateritium* НК-204 или *Gliocladium deliquescens* НК-205 или *Gliocladium deliquescens* НК-206 или консорциум этих штаммов, 35 иммобилизованных в сорбент нефти, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Штамм микромицета или	
консорциум штаммов микромицетов	20-50
Гидрофобный сорбент нефти на основе торфа	Остальное

40 Штаммы *Fusarium lateritium* и два *Gliocladium deliquescens* имеет регистрационные номера в коллекции Института биологии КНЦ УрО РАН:

*Fusarium lateritium* НК-204,  
*Gliocladium deliquescens* НК-205,  
*Gliocladium deliquescens* НК-206.

45 Штаммы получены путем селекции из нефтепродуктов и нефтезагрязненных субстратов на подкисленных средах методом чередования накопительных и чашечных культур с обязательной проверкой чистоты (Литвиненко С.Н. Защита нефтепродуктов от действия микроорганизмов. М.: Изд-во "Химия", 1977 г.). Для получения применима среда следующего состава:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,5;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 5,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 1,0,  $\text{H}_2\text{O}$  - 1 л и нефть - 5,0 г. В случае твердых питательных сред добавляют 20 г агар-агар на 1 л среды. 50

Штаммы и их консорциум, как и биосорбент в целом (микромицеты иммобилизованные в сорбенте), характеризуются как экологически нетоксичные. Экспериментальная оценка степени опасности препаратов проведена в соответствии с "Критериями отнесения

опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды", утвержденными Приказом МПР России от 15 июня 2001 г. №511. Полученные результаты подтверждены двумя стандартными методами биотестирования с применением дафний ("Определение токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний *Daphnia magna*", ФР 1.1.39.2001-00-283) и водорослей ("Определение токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей *Scenedesmus quadricauda*", ФР 1.1.39.2001-00-284). Испытания проводились в аккредитованной лаборатории Экотоксикологического анализа почв факультета почвоведения МГУ (ЛЭТАП) (аттестат аккредитации №РОСС RU.0001.513050).

Для получения посевного материала применяли среду следующего состава (г/л): 850 мл - H<sub>2</sub>O; сусло - 150 мл при pH среды - 7,0 и температуре +24°C, либо картофельно-глюкозный агар (КГА).

Штаммы *Gliocladium deliquescens* Sopp. НК-205, *Gliocladium deliquescens* Sopp. НК-206 характеризуется следующими признаками.

На среде Чапека на 7 день колонии достигают до 7 см диаметра. Колонии тонкие, со слабо развитым воздушным мицелием, в центре желтые, по краям спороносная зона имеет темнозеленую окраску. В развитых колониях образуют типичные кисточки, как у *r.Penicillium*. Конидиеносцы поднимаются от погруженного мицелия, 100-200×8-10 мкм, шероховатые. Кисточки 4-ярусные. Первичные веточки 15-20×3-3,5 мкм. Вторичные 13-15×3 мкм. Метулы 8-10×1,5-2 мкм, фиалиды 6-8×1-1,5 мкм. Конидии эллипсоидные, гладкие. Иногда гранулированные зеленоватые, 3-4×2-2,5 мкм, в слизистых головках, обильно покрывающих всю поверхность колонии, на конидиеносцах образуют головки и окружены слизью. Хорошо растет на питательных средах КАА (картофельно-аммиачный агар), на МПА (мясо-пептонный агар), на агаризованной среде сусла.

Оптимальная температура для линейного роста колоний 27-31°C, однако способен расти при температуре 6-7°C. Оптимум pH 4-7.

*Fusarium lateritium* Nees ex Fries. Телеоморфа: *Gibberella baccata* (Wallroth) Saccardo (НК-204) характеризуется следующими признаками.

Предлагаемый штамм не токсичен, способен к самовоспроизводству, развивается из посевного материала на питательной среде (пример 2), использует в качестве углерода углеводороды нефти, хорошо закрепляется на гидрофобном сорбенте.

На среде Чапека вегетативный мицелий не окрашен, колонии белые, быстро растущие, пушистые, обратная сторона неокрашена. Воздушный мицелий на картофельных агарах белый, беловато-розовый, пигмент диффундирует в среду, обратная сторона колоний имеет розовый цвет. Склероции немногочисленные, круглые. Хламидоспоры в мицелии присутствуют редко, только промежуточные. Микроконидии одноклеточные, с 1 перегородкой. Макроконидии в спородохиях и пионнотах веретинovidно-серповидные, обычно с 3 перегородками, но очень редко встречаются с 6-7 перегородками. Размеры макроконидий на картофельном агаре на 15 сутки: с 3 перегородками 38-43×3,3-3,40 мк, с 4 перегородками 35-53×3-4 мк, с 5 перегородками 38-62×3-4 мк.

Способ получения биосорбента включает иммобилизацию мицелия грибов в гидрофобный нефтяной сорбент путем обрастания сорбента, помещенного на питательную среду мицелием грибов от 20 до 50 процентов (по сухому весу), предпочтительно, с последующей сушкой полученных фракций.

Биосорбент, содержащий более 20 мас.% микроорганизмов, наносят на нефтезагрязненную водную поверхность, при этом осуществляется одновременная сорбция и биодеструкция адсорбированной нефти микроскопическими грибами.

Способ получения биосорбента и его свойства показаны на примерах.

В опыте предусматривалось первоначально обрастание сорбента мицелием грибов, затем после нанесения сорбента на нефтезагрязненную водную поверхность определение прочности закрепления грибов и деструкции ими адсорбированной сорбентом нефти.

Был поставлен опыт по обрастанию сорбента грибами штаммами *Fusarium lateritium* НК-204, *Gliocladium deliquescens* НК-205, *Gliocladium deliquescens* НК-206. Для этого в чашки Петри на стерильную фильтровальную бумагу, пропитанную 2 мл питательной среды на сусле, равномерно распределили 2 г готового сорбента СОРБОНАФТ. Культуры микроорганизмов в виде суспензии спор плотность  $10^6$  ед/мл наносили на сорбент в расчете 1 мл на 1 чашку Петри.

Через 10 дней грибы иммобилизовались в нефтяной сорбент, т.е. сорбент полностью покрылся мицелием грибов *Fusarium lateritium* и *Gliocladium deliquescens*. Биомасса иммобилизованных в сорбент микроорганизмов составляла от 20 до 50% (по сухому весу).

Затем в цилиндрические сосуды, содержащие по 100 мл воды, на поверхность наливали по 2 мл нефти, после чего на загрязненную нефтью поверхность переносили препарат биосорбента из чашек Петри.

Сорбент, находящийся на поверхности воды, полностью адсорбировал нефть. На 8-й день были взяты пробы воды и сорбента на микробиологический анализ.

Проба воды в количестве 0,1 мл и сорбент (на кончике бактериальной иглы) были нанесены на питательную среду Чапека в чашках Петри и равномерно распределены бактериальным шпателем по поверхности среды. Через 4 дня в чашках Петри с посевом воды появились только бактериальные колонии, в чашках с посевом сорбента наблюдался сплошной рост соответствующих грибов. Таким образом, можно говорить об устойчивом закреплении мицелия грибов на сорбенте. При микроскопическом исследовании было хорошо видно, как мицелий грибов пронизывает массу сорбента с нефтью. Отмечалось образование конидий и хламидоспор грибов на не погруженной в воду хорошо аэрируемой поверхности сорбента.

По истечении 15 суток инкубации грибов повторный микробиологический анализ препарата биосорбента и воды под слоем сорбента подтвердил первичное наблюдение об прочном закреплении мицелия на поверхности сорбента (1).

В таблице 1 представлено распределение микроорганизмов в сорбенте и воде.

Варианты	Таблица 1	
	Количество микроорганизмов в тыс. КОЕ на г сорбента с нефтью или на мл H <sub>2</sub> O	
	среда Чапека	среда МПА
Сорбент + нефть + <i>Fusarium lateritium</i>	403	768
H <sub>2</sub> O (под сорбентом с нефтью и <i>F.lateritium</i> )	6	970 (бактерии)
Сорбент+нефть+ <i>Gliocladium deliquescens</i>	1000	1150
H <sub>2</sub> O (под сорбентом с нефтью и <i>G.deliquescens</i> )	0	1800 (бактерии)

Из таблицы 1 видно, что количество клеток микромицетов *Gliocladium deliquescens* и *Fusarium lateritium* в сорбенте достигает 400-1000 тыс. КОЕ на 1 г сорбента, а в водной среде их количество незначительно, что позволяет судить о прочном закреплении микромицетов на сорбенте, загрязненном нефтью, и, следовательно, о возможности их применения для деструкции нефти, собранной сорбентом с водной поверхности.

Учеты, проведенные на питательной среде МПА, показывают, что из водной среды микроорганизмов выделено больше, чем из сорбента, и составляют для опыта с *Fusarium lateritium* 980 и 768 тысяч, а с *Gliocladium deliquescens* - 1800 и 1150 тыс. на 1 мл воды и 1 г сорбента соответственно. Как и в первом анализе опытных проб на 8-й день, в водной среде преобладают бактерии, однако и на сорбенте общее количество микроорганизмов довольно высокое, что связано, видимо, с развитием бактерий, стимулируемых выделениями грибов. Превышение количества микроорганизмов из водной среды объясняется тем, что грибы, разлагая нефть, выделяют водорастворимые органические биологически активные вещества, стимулирующие их развитие. Таким образом, выявляются элементы микробной сукцессии.

Под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов происходит утилизация нефти. Определение остаточной нефти в сорбенте показало, что через две недели опыта грибы (формирующийся микробный комплекс) способствовали деструкции нефти, снижение загрязнения произошло на 17% (использование *G.deliquescens*) и на 24% в опыте с

F.lateritum.

Этот опыт был повторен с консорциумом (ассоциациями) вышеуказанных грибов - *Fusarium lateritium*. + *Gliocladium deliquescens* + *Gliocladium sp.*

В течение 9 дней биосорбент активно обрастал грибами, мицелий был хорошо заметен.

5 В чашки диаметром 19 см на поверхность воды налита была нефть и на поверхность рассыпаны образцы сорбента с микроорганизмами. Нефть сорбировалась около 1 ч. Опыт продолжали 27 дней. За это время запах нефти несколько уменьшился. После 27 дней с поверхности воды сорбент был собран и помещен в лотки (на чистую пленку) для высушивания и дальнейшего анализа.

10 В таблице 2 приведены химические свойства биосорбента после окончания опыта микробиологической трансформации нефтезагрязнения.

	Химические показатели биосорбента после окончания опыта				Убыль нефти, % экспозиции на нефтезагрязненной воде
	рН	Азот гидролиз	фосфор	калий	
Fusarium lateritium + Gliocladium deliquescens - (НК-205+НК-206)	6,56	40,0	6,1	9,9	40

20 За время опыта (27 суток) заметно снизился уровень загрязнения в биосорбенте - на 40%. С разрушением нефтезагрязнения и жизнедеятельностью микроорганизмов связано заметное накопление в сорбенте элементов-биогенов (азот, фосфор, калий).

25 Как отмечено выше, опыт продолжался около 1 месяца. По его завершении на определение количества микроорганизмов были взяты пробы воды под сорбентом и самого сорбента, остававшегося на водной поверхности. Как и в первом опыте, количество микромицетов в воде под сорбентом незначительно, а в сорбенте - сплошной рост. В таблице 3 представлены результаты определения микроорганизмов в водной среде. Из таблицы 3 видно, что в водной среде количество грибов незначительно, что позволяет судить о сравнительно прочном закреплении микромицетов на сорбенте, загрязненном нефтью, и, следовательно, о возможности их применения для деструкции нефти, собранной сорбентом на водной поверхности.

Варианты сорбента с нефтедеструкторами	Количество микроорганизмов в КОЕ в 1 мл воды из-под сорбента с микроорганизмами	
	МПА	Чапика
2 штамма <i>Gliocladium deliquescens</i> и <i>Fusarium lateritium</i>	54 (бактерии)	3/0

Примечание: а/б - в числителе количество колоний грибов, в знаменателе - бактерии и дрожжи.

35 Таким образом, биосорбент, способен осуществлять одновременно сорбцию и утилизацию нефти и нефтепродуктов с водной поверхности за счет применения штаммов микромицетов и их консорциума, способных к иммобилизации к гидрофобному сорбенту.

#### Формула изобретения

40 Биосорбент для очистки водной поверхности от нефти и нефтепродуктов, включающий нефтеокисляющие микроорганизмы, взятые в эффективном количестве и носитель на основе торфа, отличающийся тем, что в качестве носителя биосорбент содержит гидрофобный сорбент нефти на основе торфа, а в качестве нефтеокисляющих микроорганизмов - биомассу штамма микромицета: *Fusarium lateritium* НК-204 или

45 *Gliocladium deliquescens* НК-205 или *Gliocladium deliquescens* НК-206 или консорциума этих штаммов, иммобилизованных в гидрофобный сорбент нефти на основе торфа путем обрастания сорбента грибами, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Биомасса штамма микромицета <i>Fusarium lateritium</i> НК-204 или	
<i>Gliocladium deliquescens</i> НК-205 или	
<i>Gliocladium deliquescens</i> НК-206 или	
консорциума штаммов микромицетов	20-50
Гидрофобный сорбент нефти на основе торфа	Остальное

50