



(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: 2005125503/13, 10.08.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.08.2005

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2007

(45) Опубликовано: 27.12.2007 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2053205 C1, 27.01.1996. RU 2214859
C1, 27.10.2003. US 4415661, 15.11.1983.
КОРОНЕЛЛИ Т.В., Принципы и методы
интенсификации биологического разрушения
углеводородов в окружающей среде (обзор).
Прикладная биохимия и микробиология. 1996, т.
32, № 6, с.579-585.

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 Мубараковна (RU),
Терехова Вера Александровна (RU),
Арчегова Инна Борисовна (RU),
Ибатуллина Инна Зайтуновна (RU),
Яковлев Александр Сергеевич (RU),
Трофимов Сергей Яковлевич (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),
Автономная некоммерческая организация
Экспертно-аналитический центр по проблемам
окружающей среды "ЭКОТЕРРА" (RU)

(54) МИКОСОРБЕНТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ОТ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

(57) Реферат:

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. Микосорбент содержит гидрофобный нефтяной сорбент на основе торфа и биомассу штаммов нефтеокисляющих микромицетов, выбранных из штамма *Fusarium solani* ЦБ-МГУ 1 или штамма *Fusarium moniliforme* ИБ-МГУ 2, или штамма

Trichoderma harzianum ИБ-МГУ 3, или штамма *Cladosporium resinae* ИБ-МГУ 4 или консорциума этих штаммов, иммобилизованных в сорбент нефти путем обрастания сорбента грибами. Изобретение позволяет 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 путем обрастания и характеризующихся высокой биодеструкционной активностью при ликвидации интенсивных (более 40% нефти) загрязнений в возрасте более 3 месяцев. 1 табл.



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: **2005125503/13, 10.08.2005**(24) Effective date for property rights: **10.08.2005**(43) Application published: **20.02.2007**(45) Date of publication: **27.12.2007 Bull. 36**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Khabibullina Flijuza Mubarakovna (RU),
Terekhova Vera Aleksandrovna (RU),
Archegova Inna Borisovna (RU),
Ibatullina Inna Zajtunovna (RU),
Jakovlev Aleksandr Sergeevich (RU),
Trofimov Sergej Jakovlevich (RU),
Taskaev Anatolij Ivanovich (RU),
Tuljankin Gennadij Mihajlovich (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),
Avtonomnaja nekommercheskaja organizatsija
Ehkspertno-analiticheskij tsentr po problemam
okruzhajushchej sredy "EhKOTERRA" (RU)**

(54) **MYCOSORBENT FOR CLEANING OIL-POLLUTED WATER SURFACE**

(57) Abstract:

FIELD: sorbent-mediated oil pollution elimination.

SUBSTANCE: invention is directed to cleaning surface of natural and artificial reservoirs, waste waters, and industrial effluents polluted with crude oil and petroleum products with simultaneous utilization of pollutants by microorganisms. Mycosorbent consists of hydrophobic peat-based petroleum sorbent and biomass composed of oil-oxidizing micromycets

selected from strains solani IB-MGU 1, Fusarium moniliforme IB-MGU 2, Trichoderma harzanium IB-MGU 3, Cladosporium resinae IB-MGU 4, and consortium of these strains immobilized in sorbent via accretion of sorbent with fungi.

EFFECT: increased biodestruction activity when treating heavy pollutions (more than 40% oil) an the age of more than 3 months and enabled utilization of pollutants.

1 tbl

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 сорбента, способного 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 путем обрастания и характеризующихся высокой биодеструкционной активностью при ликвидации интенсивных (более 40% нефти) загрязнений в возрасте более 3 месяцев.

В этом состоит технический результат.

30 Результат достигается тем, что миксорбент для очистки водной поверхности от нефтяных загрязнений, включающий нефтеокисляющие микроорганизмы, взятые в эффективном количестве и носитель на основе торфа отличающийся тем, что в качестве носителя содержит гидрофобный нефтяной сорбент, в качестве нефтеокисляющих микроорганизмов - штаммы микромицетов, выбранные из *Fusarium moniliforme*, *F. solani*, *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium resinae* (= *Amorphotheca resinae*) или консорциум этих штаммов, иммобилизованных в сорбент нефти путем обрастания сорбента грибами, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Штамм микромицета или	
консорциум штаммов микромицетов	20-50
Гидрофобный нефтяной сорбент на основе торфа	остальное

40

"Штаммы *Fusarium solani*, *F. moniliforme* и *Trichoderma harzianum* *Cladosporium resinae* не депонированы и хранятся в отделе почвоведения Института биологии КНЦ УрО РАН и лаборатории экотоксикологического анализа почв факультета почвоведения МГУ им. Ломоносова и имеют обозначения присвоенные авторами:

45

- *Fusarium solani* ИБ-МГУ 1;
- *F. moniliforme* ИБ-МГУ 2;
- *Trichoderma harzianum* ИБ-МГУ 3;
- *Cladosporium resinae* (*Amorphotheca resinae*) ИБ-МГУ 4".

50

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.: Химия, 1977 г.). Для получения применима среда следующего состава: K_2HPO_4 - 2,5; NH_4NO_3 - 5,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0, H_2O - 1 л и нефть - 5,0 г. В

случае твердых питательных сред добавляют 20 г агар-агар на 1 л среды.

Штаммы и их консорциум, как и микоосорбент в целом (микробицеты, иммобилизованные в сорбенте) характеризуются как экологически нетоксичные.

5 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).

15 Для получения посевного материала применяют среду следующего состава, г/л: 850 мл - H₂O; сусло - 150 мл при pH среды - 7,0 и температуре +24°C, либо картофельно-глюкозный агар (КГА).

Характеристика культур.

Fusarium solani (Mart.) Appel&Wollenw. Телеоморфа: *Nectria haematococca* Berk.&Br.

20 Колонии характеризуются довольно высокой скоростью роста - на картофельно-глюкозном агаре (КГА) за 4 дня при T° 25°C достигают 3-2 см в диаметре. Воздушный мицелий белый, слабо-пушистый, на котором в массе образуются розоватые спородохии. Микроконидии обильные (разм. 8-14×2-4 мкм), образуются на удлинённых слегка разветвленных конидиеносцах. Септированные (с 3-мя перегородками) макроконидии (разм. 28-42×4-6 мкм) в умеренном количестве развиваются на коротких разветвленных конидиеносцах, которые вскоре формируют спородохии. Образует округлые хламидоспоры 6-10 мкм в диаметре, конечные и промежуточные, гиалиновые. Способен к анаэробному росту, однако при этом хламидоспоры не образуются.

30 Усваивает большой набор Сахаров и сахароспиртов. Хорошо развивается при пониженном содержании кислорода. Выдерживает 20%-ное содержание CO₂ без изменения скорости роста. Обладает широким спектром биологически активных веществ и экзоферментов, участвующих в деградации целлюлозе- и кератинсодержащих субстратов, 1-нафтола, пестицидов, моноспиртов и большого количества n-парафинов.

35 Оптимальная температура для линейного роста колоний 27-31°C, однако способен расти при температуре 6-7°C. Оптимум pH 6-5.

Штамм *Fusarium moniloforme* Sheld. Телеоморфа: *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wollenw.

40 Колонии плотные пушистые розоватые. Микроконидии одноклеточные формируются в цепочках из монофиалид на разветвленных конидиофорах воздушного мицелия. Макроконидии с заостренными концами серповидные, обычно с 3-мя перегородками образуются редко.

45 В качестве источников углерода способен потреблять глюкозу, маннозу, галактозу, фруктозу, рамнозу, арабинозу, ксилозу, рибозу, сахарозу, крахмал, сорбитол и др. Продуцирует широкий спектр ферментов и биологически активных веществ, участвующих в разложении целлюлозосодержащих природных и искусственных субстратов, в деградации гербицидов, окислении углеводов (алканов и парафинов). Способен к синтезу биостимуляторов роста (светом стимулируется синтез гиббереллина пр.)

Способен расти в анаэробных условиях, толерантен к 15%-ному содержанию NaCl в среде, что важно при ликвидации нефтяных загрязнений и сопутствующих пластовых вод.

50 Оптимальная температура роста 22.5-27.5°C, минимальная 2.5-5.0°C.

Trichoderma harzianum Rifai. Телеоморфа: *Hypocrea* sp. Webster

Колонии быстрорастущие - на 5 сутки достигают в диаметре более 9 см при 20°C.

Мицелий бесцветный, стелющийся, паутинистый. Спороношение темно-зеленого цвета появляется на 3-5 день роста. Обратная сторона колонии бесцветная. Пигмент в среду не

выделяется. Экссудат бесцветный. Запах отсутствует. Гифы бесцветные, гладкие 2.0-6.0 мкм в диаметре. Конидиеносцы неокрашенные, гладкие, прямые, несколько большего диаметра - 4.0-8.0 мкм. Обильно образует интеркалярные хламидоспоры. Фиалиды расположены на веточках мутовками по 2-6, редко по одной. Конидии гладкие зеленые, собраны в слизистые округлые головки размером 2.0-3.5×1.5-2.7 мкм.

Активно продуцирует гидролазы, растет на парафинах нефти.

Оптимум температурного роста широкий 15-35°C, pH 3.7-4.7, при подщелачивании среды рост замедляется, толерантен к 5%-ному содержанию в среде NaCl.

Cladosporium resinae (Lindau) G.A. de Vries (= *Amorphotheca resinae* Parbery)

Колонии относительно быстрорастущие, на сусло-агаре при 20°C в течение 10 дней достигают 2-3 см в диаметре. Поверхность колонии серовато-коричневая, обратная сторона (реверс) - темная оливково-коричневая. Конидиеносцы длиной 30-120 мкм, диаметром 4-5 мкм, прямые или слегка изогнутые, гладкие (бородавчатые), несколько темнее, чем вегетативные гифы. Гладкостенные эллипсоидные конидии размером 3-7×2-4 мкм формируются на нескольких уровнях, часто в цепочках. Образуют округлые хламидоспоры диаметром 9-13 мкм.

В качестве источника углерода использует мальтозу, D-глюкозу, D-ксилозу, D-галактозу, L-арабинозу и др. В качестве источника азота - пептон, сульфат аммония, нитраты. Способен к деградации крезола, керосина, фенолов, растительных масел дизельного топлива. Быстро утилизирует углеводороды (C₉-C₁₉), несколько медленнее - с более длинной цепью. Растет на древесине, обработанной медь-, хром-, мышьяксодержащими консервантами, асфальтовом покрытии, может быть причиной коррозии металлов.

Оптимальная температура роста около 30°C, но полное торможение роста происходит лишь при 0 и выше 50°C, при температуре ниже 10°C и выше 40°C рост замедленный. Гриб растет в широком диапазоне - pH 3-8.

Способ получения микосорбента включает иммобилизацию путем обрастания готового нефтяного гидрофобного сорбента на основе торфа мицелием грибов от 20 до 50 процентов (по сухому весу) с последующей сушкой полученных фракций.

Микосорбент, содержащий не менее 20% микроорганизмов, наносят на нефтезагрязненную водную поверхность, при этом осуществляется одновременная и биодеструкция адсорбированной нефти микроскопическими грибами.

Способ получения микосорбента и его свойства показаны на примерах.

В качестве готового гидрофобного сорбента использовали нефтяной сорбент СОРБОНАФТ.

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.

Способность мицелия микромицетов *F.solani*, *F.moniliforme*, *T.harzianum* обрастать сорбент испытывалась в лабораторных условиях. Для этого в каждую чашку Петри (диаметром 90 мм) на предварительно простерилизованную автоклавированием фильтровальную бумагу, пропитанную питательной средой (пивное неохмеленное сусло) (из расчета 2 мл на один диск фильтровальной бумаги), равномерно распределили 2 г сорбента. Культуры микроорганизмов в виде суспензии спор плодность 10⁶ ед./мл наносили на сорбент в расчете 1 мл на 1 чашку Петри.

Через 10 дней сорбент полностью покрывался мицелием грибов. 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 микосорбента из чашек Петри.

Сорбент полностью адсорбировал нефть и в течение 8 дней находился на поверхности воды. 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

5 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.

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

15 Данные об эффективности очистки поверхности воды от нефти и нефтепродуктов с помощью предложенного микосорбента и характеристика некоторых физико-химических свойств сорбента и его эффективности в процессе биологической трансформации нефти представлены в таблице 1.

Последующая экспериментальная проверка показала заметное (на 22.5-40%) снижение уровня загрязнения микосорбента нефтью как с препаратами на основе монокультур грибов, так и в ассоциациях. Для получения препарата в большем количестве следует описанную процедуру выполнять на поверхностях большей площади.

20 Пример. Для получения микосорбента в качестве компонентов брали штаммы микромицета *Fusarium Solani* ИБ-МГУ 1, или *Fusarium moniliforme* ИБ-МГУ 2, или *Trichoderma harzianum* ИБ-МГУ 3, или *Cladosporium resinae* ИБ-МГУ 4 (= *Amorphotheca resinae*), или консорциум этих штаммов и гидрофобный нефтяной сорбент

25 «СОРБОНАФТ». Осуществляли иммобилизацию штамма в сорбент путем обрастания по вышеописанному способу. По окончании процесса обрастания полученную фракцию высушивали и определяли количественное соотношение биомассы штаммов и гидрофобного сорбента. Содержание биомассы штамма иммобилизованного в гидрофобный сорбент и биодеструктивная активность полученных биосорбентов

30 приведены в таблице 1.

№ п/п	Вариант	Убыль нефти, %	Биомасса штамма, иммобилизованного в гидрофобный сорбент, %	Химические показатели микосорбента через 27 суток после нанесения на нефтезагрязненную поверхность воды				Доля осевшего на дно сорбента, % к исходному
				pH	азот гидролиз.	фосфор	калий	
1	<i>Fusarium moniliforme</i> ИБ-МГУ 2	32.0	31	6.51	9.8	3.4	26.8	6.9
2	<i>Fusarium solani</i> ИБ-МГУ 1	22.5	20	7.13	7.0	2.3	14.6	9.4
3	<i>Cladosporium resinae</i> ИБ-МГУ 4 (= <i>Amorphotheca resinae</i>)	36,3	50	6.58	4.2	0.8	10.9	3.5
4	<i>Trichoderma harzianum</i> ИБ-МГУ 3	35.5	41	6.66	7.0	9.5	16.2	10.3
5	Консорциум штаммов микромицетов	42,0	35	6,7	8,5	4,2	22,2	7,0

Формула изобретения

Микосорбент для очистки водной поверхности от нефтяных загрязнений, включающий нефтеокисляющие микроорганизмы, взятые в эффективном количестве, и носитель на основе торфа, отличающийся тем, что в качестве носителя он содержит гидрофобный нефтяной сорбент, в качестве нефтеокисляющих микроорганизмов - биомассу штамма микромицета: *Fusarium solani* ИБ-МГУ 1, или *Fusarium moniliforme* ИБ-МГУ 2, или *Trichoderma harzianum* ИБ-МГУ 3, или *Cladosporium resinae* ИБ-МГУ 4, или консорциума этих штаммов, иммобилизованных в гидрофобный нефтяной сорбент путем обрастания

сорбента микромицетами, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

	Биомасса штамма микромицета	
	Fusarium solani ИБ-МГУ 1, или	
	Fusarium moniliforme ИБ-МГУ 2, или	
5	Trichoderma harzianum ИБ-МГУ 3, или	
	Cladosporium resinae ИБ-МГУ 4, или	
	консорциума штаммов микромицетов	20-50
	Гидрофобный нефтяной сорбент на основе торфа	Остальное
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		