



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C02F 3/34 (2006.01)
C12N 1/26 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)
C12R 1/06 (2006.01)
C12R 1/72 (2006.01)
C12R 1/73 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006104082/13, 10.02.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.02.2006

(43) Дата публикации заявки: 20.09.2007

(45) Опубликовано: 10.03.2008 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2115727 C1, 20.07.1998. US 4415661, 15.11.1983. БЕЛЬКЕВИЧ П.И. и др. Гранулированный торф для очистки сточных вод от нефтепродуктов. Торфяная промышленность, №10, 1984, с.15-17. КОРОНЕЛЛИ Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор). Прикладная биохимия и микробиология, 1996, том. 32, №6, 579-585.

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Хабибуллина Флюза Мубараковна (RU),
Арчегова Инна Борисовна (RU),
Шубаков Анатолий Александрович (RU),
Шарапова Ирина Эдмундовна (RU),
Романов Геннадий Григорьевич (RU),
Чернов Иван Юрьевич (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 ВОДОЕМОВ ОТ НЕФТЕПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ

(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. Биосорбент включает нефтеокисляющие микроорганизмы, а именно биомассу штамма бактерий *Rhodococcus erythropolis* НК-16 или *Arthrobacter sp.* НК-15 или дрожжевого гриба *Candida lipolytica* КБП-3308 или *Candida guilliermondii* КБП-3175, или *Pichia*

guilliermondii КБП-3205, или их бактериально-дрожжевого консорциума, иммобилизованного в гидрофобный сорбент нефти на основе торфа путем обрастания сорбента бактериями и/или грибами. Изобретение позволяет осуществлять одновременно сорбцию и утилизацию нефти и нефтепродуктов с водной поверхности за счет применения штаммов бактерий и дрожжевых грибов, способных к иммобилизации на гидрофобном сорбенте и характеризующихся высокой биодеструкционной активностью при ликвидации интенсивных (более 40% нефти) загрязнений. 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C02F 3/34 (2006.01)*C12N 1/26* (2006.01)*C12R 1/00* (2006.01)*C12R 1/06* (2006.01)*C12R 1/72* (2006.01)*C12R 1/73* (2006.01)*C12R 1/84* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006104082/13, 10.02.2006**(24) Effective date for property rights: **10.02.2006**(43) Application published: **20.09.2007**(45) Date of publication: **10.03.2008 Bull. 7**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Khabibullina Fljuza Mubarakovna (RU),
Archegova Inna Borisovna (RU),
Shubakov Anatolij Aleksandrovich (RU),
Sharapova Irina Ehdmondovna (RU),
Romanov Gennadij Grigor'evich (RU),
Chernov Ivan Jur'evich (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) **BIOLOGICAL SORBENT BASED ON BACTERIAL AND YEAST FUNGI STRAINS FOR CLEANING PETROLEUM PRODUCT-POLLUTED WATER RESERVOIRS**

(57) Abstract:

FIELD: oil pollution elimination.

SUBSTANCE: object of invention is cleaning surface of natural and man-made water reservoirs, waste waters, and liquid industrial effluents polluted with crude oil and petroleum products with simultaneous utilization of pollutants by microorganisms. Biological sorbent comprises oil-oxidizing microorganisms, namely biomass of bacterial strain *Rhodococcus erythropolis* NK-16 or *Arthrobacter* sp. NK-15, or yeast fungus *Candida lipolytica* KBP-3308 or *Candida*

guilliermondii KBP-3175, or *Pichia guilliermondii* KBP-3205, or bacterial-yeast consortium thereof immobilized on peat-based hydrophobic oil sorbent by way of growing bacteria and/or fungi on sorbent. Biosorbent is characterized by high biodestruction activity when used to eliminate intensive (more than 40% oil) pollutions.

EFFECT: enabled simultaneously sorption and utilization of crude oil or petroleum products by immobilized bacteria and yeast fungi.

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 насыпного 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, что является экономически не выгодным.

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 поверхности воды.

Задачей изобретения является получение биосорбента, способного осуществлять одновременно сорбцию и утилизацию нефти и нефтепродуктов с водной поверхности за счет применения микроорганизмов, способных к иммобилизации на гидрофобном сорбенте и характеризующихся высокой биодеструкционной активностью при ликвидации интенсивных (более 40% нефти) загрязнений.

В этом состоит технический результат.

Технический результат достигается тем, что биосорбент для очистки водной поверхности от нефти и нефтепродуктов, включающий нефтеокисляющие микроорганизмы, 30 взятые в эффективном количестве, и носитель, отличается тем, что в качестве носителя содержит гидрофобный нефтяной сорбент на основе торфа, в качестве нефтеокисляющих микроорганизмов - штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter sp.* или дрожжевые грибы *Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Pichia guilliermondii*, или их бактериально-дрожжевой консорциум, иммобилизованный на нефтяном сорбенте, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

штаммы бактерий или	
дрожжевые грибы, или	
бактериально-дрожжевой консорциум	20-30
гидрофобный нефтяной сорбент на основе торфа	остальное.

40 Штаммы бактерий (*Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter sp.*) и дрожжевых грибов (*Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Pichia guilliermondii*) не депонированы, хранятся в коллекции Института биологии КНЦ УрО РАН, дрожжевые культуры также хранятся на кафедре биологии почвы факультета почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова. Авторами разработки штаммам и грибам присвоены следующие обозначения:

45 *Rhodococcus erythropolis* - НК-16;
Arthrobacter sp. - НК-15;
Candida lipolytica - КБП-3308;
Candida guilliermondii - КБП-3175;
Pichia guilliermondii - КБП-3205.

50 Штаммы микроорганизмов получены путем их выделения из нефтепродуктов и нефтезагрязненных субстратов на питательных средах методом чередования накопительных и чашечных культур с обязательной проверкой чистоты (Литвиненко С.Н. Защита нефтепродуктов от действия микроорганизмов. - М.: Изд-во «Химия», 1977). Для

выделения культур микроорганизмов применима среда следующего состава: KH_2PO_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 агара на 1 л среды.

5 Микроорганизмы и их консорциум, как и биосорбент в целом, 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
10 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
15 экотоксикологического анализа почв факультета почвоведения МГУ (ЛЭТАП) (аттестат аккредитации №РОСС RU.0001.513050).

Rhodococcus erythropolis (НК-16) получен путем селекции из природных образцов нефтесодержащих почв 203-й скважины Усинского района Республики Коми. Идентифицирован Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина
20 13.04.01. Грамположительные бактерии образуют слизистые колонии кремового цвета на большинстве питательных сред. В молодых культурах преобладают прямые или слегка искривленные слабо ветвящиеся палочки, которые с возрастом распадаются до кокковидных форм.

Arthrobacter sp. (НК-15) выделен из нефтезагрязненной почвы 203-й скважины Усинского района Республики Коми в 1999 г. Грамотрицательные аэробные палочковидные
25 бактерии образуют слизистые округлые колонии кремового цвета на МПА.

Candida guilliermondii (КБП-3176; НК-302) предоставлена авторами из коллекции микроорганизмов кафедры биологии почвы факультета почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова. Выделена в НИИ генетики промышленных микроорганизмов в 1990 г. из
30 ароматических углеводов. Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.

Pichia guilliermondii (КБП-3205; НК-303) предоставлена авторами из коллекции микроорганизмов кафедры биологии почвы факультета почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова, выделена в 1982 г. из имаго *Aedes diaetaeus*. Томская область,
35 п.Басандайка. Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.

Candida lipolytica (КБП-3308; НК-304, анаморфа - *Yarrowia lipolytica*) предоставлена авторами из коллекции кафедры биологии почвы факультета почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова, выделена в 1992 г. из пластовых вод Бондюжского нефтяного месторождения. Колонии на среде сусла гладкие, серо-белые, мелкозернистые.
40

Способ получения биосорбента включает иммобилизацию на нефтяном гидрофобном сорбенте дрожжевых грибов *Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Pichia guilliermondii* и культур бактерий *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter* sp. в количестве от 10 до 50 процентов (по сухому весу) с последующей сушкой на воздухе. Биосорбент, содержащий не менее 20% микроорганизмов, наносят на нефтезагрязненную
45 водную поверхность, при этом осуществляется одновременная биодеструкция адсорбированной нефти бактериально-дрожжевой ассоциацией.

Способ получения биосорбента и его свойства показаны на примерах. В качестве гидрофобного нефтяного сорбента на основе торфа использовали сорбент с торговым названием «СОРБОНАФТ».

50 В опыте предусматривалось иммобилизирование микроорганизмов в нефтяной сорбент, затем, после нанесения сорбента на нефтезагрязненную водную поверхность, определение степени деструкции ими адсорбированной сорбентом нефти.

В условиях лаборатории проведены испытания биосорбента с целью оптимизации

процесса деградации нефти на загрязненных водных поверхностях. В соответствии с этим в первой части опыта сорбент обогащали микроорганизмами, во второй полученный биосорбентобогащенный микроорганизмами сорбент распыляли на водную поверхность с нанесенным на нее определенным количеством нефти.

5 I. В небольшие емкости (лотки) на дно наливали по 20 мл питательной среды (15% неохмеленное пивное сусло), 20 г сорбента «СОРБОНАФТ» помещали в лоток, затем сверху распределяли по 20 мл культуры микроорганизмов (м/о). Лотки помещали в небольшие полиэтиленовые мешочки для уменьшения испарения влаги. Рост микроорганизмов продолжался в течение 9 суток.

10 Использовали следующие м/о:

1. *Pichia guilliermondii*;
2. *Candida lipolytica*;
3. *Candida guilliermondii*;
4. *Rhodococcus erythropolis*;

15 5. *Arthrobacter* sp.;

6. *Pichia guilliermondii* + *Candida lipolytica* + *Candida guilliermondii* + *Rhodococcus erythropolis* + *Arthrobacter* sp.

Внешних признаков изменения массы сорбента не наблюдалось, хотя можно было заметить некоторое уплотнение массы сорбента. Через 9 дней была выполнена вторая часть опыта.

20 II. В чашки диаметром 19 см была налита вода, расстояние от края до уровня воды составило 1,5-2 см. На поверхность воды была налита нефть и затем были рассыпаны образцы биосорбента. Нефть сорбировалась в течение нескольких минут. Исходное содержание нефти составило 46%. После 27 суток опыта с поверхности воды биосорбент

25 был собран и помещен в лотки для высушивания и дальнейшего анализа. Под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов происходит утилизация нефти. Определение остаточной нефти в сорбенте показало, что через две недели опыта бактерии (*Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter* sp.) и дрожжевые грибы (*Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Pichia guilliermondii*) способствовали деструкции нефти, снижение загрязнения произошло на 31,5% (при использовании *Candida lipolytica*), на 30% (при использовании *Candida guilliermondii* или *Pichia guilliermondii*) и на 35% и 33% в вариантах с *Rhodococcus erythropolis* и *Arthrobacter* sp.

Этот опыт был повторен с консорциумом (ассоциацией) вышеуказанных микроорганизмов (*Rhodococcus erythropolis*+*Arthrobacter* sp.+*Candida lipolytica*+*Candida guilliermondii*+*Pichia guilliermondii*).

35 В течение 9 суток биосорбент активно обрастал грибами, мицелий был хорошо заметен. В чашки диаметром 19 см на поверхность воды была налита нефть и на поверхность были рассыпаны образцы сорбента с микроорганизмами. Нефть сорбировалась около 1 ч. После 27 суток опыта с поверхности воды сорбент был собран и помещен в лотки для

40 высушивания и дальнейшего анализа. В таблице 1 приведены химические свойства биосорбента после микробиологической трансформации нефтезагрязнения. Как видно из таблицы 1, имело место заметное (на 30-41%) снижение уровня загрязнения биосорбентов нефтью как с препаратами на основе монокультур микроорганизмов, так и в их ассоциациях. За время опыта (27 суток) уровень

45 загрязнения в биосорбенте с использованием комплекса микроорганизмов (*Candida lipolytica* + *Candida guilliermondii* + *Pichia guilliermondii* + *Arthrobacter* sp. + *Rhodococcus erythropolis*) снизился на 41%. С разрушением нефтезагрязнения и жизнедеятельностью микроорганизмов связано заметное накопление в сорбенте элементов-биогенов (азот, фосфор, калий).

50 По завершении опыта для определения количества микроорганизмов были взяты пробы воды под сорбентом и самого сорбента, остававшегося на водной поверхности. Количество микроорганизмов в воде под сорбентом незначительно, а в сорбенте - сплошной рост, что позволяет судить о сравнительно прочном закреплении дрожжевых грибов и бактерий на

сорбенте, загрязненном нефтью, и, следовательно, о возможности их применения для деструкции нефти, собранной сорбентом на водной поверхности.

Последующая опытно-производственная проверка адсорбционной и нефтеструктурной способности биопрепарата в полевых условиях (на водной нефтестраженной поверхности в Усинском районе Республики Коми) показала высокую сорбционную способность (1 часть биопрепарата:6 частей нефти) и заметное (на 51%) снижение уровня загрязнения нефти в биосорбенте за вегетационный период.

Пример.

Для получения биосорбента в качестве компонентов брали штаммы бактерий: Rhodococcus erythropolis НК-16 или Arthrobacter sp. НК-15 или дрожжевого гриба: Candida lipolytica КБП-3308 или Candida guilliermondii КБП-3175, или Pichia guilliermondii КБП-3205, или их бактериально-дрожжевого консорциума и гидрофобный нефтяной сорбент «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 приведены в таблице 1.

Таким образом, биосорбент способен осуществлять одновременно сорбцию и утилизацию нефти и нефтепродуктов с водной поверхности за счет применения штаммов бактериально-дрожжевого консорциума, способных к иммобилизации на гидрофобном сорбенте.

Вариант	Химические показатели биосорбента				Убыль нефти, %	Биомасса штамма, иммобилизованного в гидрофобный сорбент, %
	рН	азот гидролиз.	фосфор	калий		
Candida lipolytica КБП-3308	4,59	8,4	7,6	14,8	31,5	25
Candida guilliermondii КБП-3175	6,70	6,9	6,8	12,8	30,0	24
Pichia guilliermondii КБП-3205	6,74	6,4	6,1	12,3	30,0	28
Rhodococcus erythropolis НК-16	6,10	7,0	7,2	17,9	35,0	20
Arthrobacter sp. НК-15	6,00	6,8	7,5	16,9	33,0	30
Candida lipolytica КБП-3308 + Candida guilliermondii КБП-3175 + Pichia guilliermondii КБП-3205 + Arthrobacter sp. НК-15 + Rhodococcus erythropolis НК-16	6,36	7,0	2,6	10,6	41,0	24

Формула изобретения

Биосорбент для очистки водоемов от нефтепродуктов, включающий нефтеокисляющие микроорганизмы, взятые в эффективном количестве, и носитель, отличающийся тем, что в качестве носителя биосорбент содержит гидрофобный нефтяной сорбент на основе торфа, а в качестве нефтеокисляющих микроорганизмов - биомассу штамма бактерии - Rhodococcus erythropolis НК-16 или Arthrobacter sp. НК-15, или дрожжевого гриба Candida lipolytica КБП-3308 или Candida guilliermondii КБП-3175 или Pichia guilliermondii КБП-3205 или их бактериально-дрожжевого консорциума, иммобилизованного в гидрофобный сорбент нефти на основе торфа путем обрастания сорбента бактериями и/или грибами, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

биомасса штамма бактерий:	
Rhodococcus erythropolis НК-16 или	
Arthrobacter sp. НК-15 или	
дрожжевого гриба Candida lipolytica КБП-3308 или	
Candida guilliermondii КБП-3175 или	
Pichia guilliermondii КБП-3205	
или их бактериально-дрожжевого консорциума	20-30
гидрофобный сорбент нефти на основе торфа	остальное