



(51) МПК
C12N 1/26 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
B09C 1/02 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011124577/10, 16.06.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 16.06.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.06.2011

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2012 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 20.12.2013 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2318736 C2, 10.03.2008. RU 2031860 C1, 27.03.1995. RU 2081854 C1, 20.06.1997. RU 2322400 C1, 20.04.2008. RU 2393215 C2, 27.06.2010. ЦЕМЕЛИНИНА Т.Н.

Активность некоторых ферментов как индикаторов процесса биodeградации нефти в почве. Традиционная молодежная научная конференция Актуальные проблемы// Материалы докладов. - Сыктывкар: Республика (см. прод.)

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул.
 Коммунистическая, 28, Институт биологии
 Коми научного центра УрО РАН,
 Инновационная группа

(72) Автор(ы):

Щемелинина Татьяна Николаевна (RU),
 Маркарова Мария Юрьевна (RU),
 Шарапова Ирина Эдмундовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. (RU)

RU 2 501 852 C2

RU 2 501 852 C2

(54) ПРЕПАРАТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для очистки загрязненных нефтью почв. Препарат, содержащий биодеструктор нефтяного загрязнения, представляет собой фугат культуральной жидкости микробной массы консорциума нефтеокисляющих микроорганизмов, иммобилизованных на торфонosite. При этом в состав

консорциума входят: штамм бактерий *Rhodococcus equi* НИИ КKM В-1115, дрожжей *Rhodotorula glutinis* НИИ КKM Y-1113 и штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* ВНИИ КKM Y-1114 в соотношении 1:1:1 соответственно, выращенные совместно. Изобретение позволяет улучшить качество очистки почвы от нефти и нефтепродуктов в условиях с пониженными температурами. 2 табл.

(56) (продолжение):

Коми, Россия, 3-7 апреля 2007 г, стр.282-285. ЦЕМЕЛИНИНА Т.Н., АНЧУГОВА Е.М. Влияние источника углеродного питания на интенсивность продуцирования ферментов нефтеокисления ацидофильными микроорганизмами. I (XIV) Всероссийская молодежная научная конференция

R U 2 5 0 1 8 5 2 C 2

R U 2 5 0 1 8 5 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/26 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
B09C 1/02 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011124577/10, 16.06.2011**

(24) Effective date for property rights:
16.06.2011

Priority:

(22) Date of filing: **16.06.2011**

(43) Application published: **27.12.2012 Bull. 36**

(45) Date of publication: **20.12.2013 Bull. 35**

Mail address:

**167982, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja, 28,
Institut biologii Komi nauchnogo tsentra UrO
RAN, Innovatsionnaja gruppa**

(72) Inventor(s):

**Shchemelinina Tat'jana Nikolaevna (RU),
Markarova Marija Jur'evna (RU),
Sharapova Irina Ehdmondovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Institut biologii Komi
nauchnogo tsentra Ural'skogo otdelenija
Rossijskoj akademii nauk. (RU)**

(54) PREPARATION FOR CLEANING OF SOIL FROM OIL AND OIL PRODUCTS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: preparation containing biodestructor of oil contamination represents centrate of cultural liquid of microbial mass of consortium of oil-oxidising microorganisms immobilised on peat carrier. Consortium composition includes the following: Rhodococcus eqvi SRI MCC

B-1115 bacteria strain, Rhodotorula glutinis SRI MCC Y-1113 yeast and Rhodotorula glutinis ARSRI MCC Y-1114 yeast strain in the ratio of 1:1:1 respectively, which have been grown jointly.

EFFECT: invention allows improving quality of soil cleaning from oil and oil products under conditions with reduced temperatures.

2 tbl

Изобретение относится к нефтяной промышленности и экологии и может быть использовано для очистки загрязненных нефтью почв.

Одним из наиболее опасных загрязнителей являются нефть и нефтепродукты, ежегодное попадание которых в окружающую среду оценивается в сотни миллионов тонн. В практике рекультивационных работ при очистке нефтезагрязненных земель использование биопрепаратов нефтеокисляющего действия занимает не последнее место.

Известен препарат-биодеструктор нефтяного загрязнения микробно-ферментный Микрозим(тг.) "ПЕТРО ТРИТ" (<http://www.microzym.ru/oilspills.htm>), производитель ООО «РСЭ Трейдинг», санитарно-эпидемиологическое заключение №77.99.02.515.Д.001102.03.05 от 11.03.2005. Препарат представляет собою полностью натуральный биологический деструктор нефтяных углеводородов, предназначенный для экологически безопасной очистки почвенных покровов и водных объектов от нефтяного загрязнения. В качестве активных элементов препарат содержит консорциум из (12) штаммов живых углеводородокисляющих микроорганизмов в виде концентрата сухих спор с концентрацией, равной 4×10^{12} КОЕ/гр., набор натуральных микробных ферментов, минеральные соли азота, калия, фосфора, экологически чистый питающий носитель из пищевой кукурузной муки, органоминеральную подкормку.

Препарат предназначен для биологической очистки почвенных покровов, песка, шламов, сточных вод, водных объектов и других неагрессивных сред от загрязнения нефтью и нефтепродуктами: бензином, дизельным топливом, мазутом, моторными маслами, сырой нефтью.

Недостатками ПЕТРО ТРИТа являются:

- увеличение затрат на производство, т.к в состав препарата входит большее количество штаммов микроорганизмов;
- носителем ПЕТРО ТРИТа является пищевая кукурузная мука - менее доступная в отдаленных северных регионах и соответственно более дорогостоящая для ввоза;
- препарат не способен осуществлять очистку от нефти и нефтепродуктов в экологически неблагоприятных условиях.

Основой для производства биопрепаратов служат штаммы культур нефтеокисляющих микроорганизмов. В большинстве случаев целевым продуктом процесса культивирования в технологии производства бактериальных препаратов является микробная масса, а оставшаяся после ее отделения, отработанная культуральная жидкость (фугат), является отходом производства. После центрифугирования фугат собирается в специальные емкости, где подвергается термической обработке, после которой сливается. Слив фугата влечет за собой загрязнение окружающей среды и расходы, связанные с природоохранными мероприятиями. Так же фугат, обогащенный биологически активными веществами, может быть использован для биорекультивации загрязненных нефтью и нефтепродуктами земель.

Задачей изобретения является получение нового препарата, способного осуществлять утилизацию нефти и нефтепродуктов из почвы, когда окружающие условия неблагоприятны для деятельности микроорганизмов. Под неблагоприятными условиями подразумевается низкая температура, повышенная влажность, криоморфные почвы и т.д.

Технический результат состоит в улучшении качества очистки почв от нефти и нефтепродуктов в условиях Крайнего Севера, в возможности использования в

регионах с пониженными температурными условиями окружающей среды, в отличии от микробных препаратов.

Технический результат достигается тем, что препарат для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов, содержащий биодеструктор нефтяного загрязнения, согласно изобретения представляющий собой фугат культуральной жидкости микробной массы консорциума нефтеокисляющих микроорганизмов, иммобилизованный на торфоносителе, причем в состав консорциума входят: штамм бактерий *Rhodococcus eqvi* В-1 115, штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* НИИ ККМ У-1114, штамм дрожжей НИИ ККМ *Rhodotorula glutinis* У-1113, взятых при соотношении 1:1:1, выращенных совместно.

Фугат, являющийся в промышленном производстве микробных препаратов отходом, представляет собой культуральную жидкость, содержащую продукты метаболизма бактерий, в том числе внеклеточные ферменты, выделенные в среду в процессе выращивания микробной массы, которые проявляют устойчивость к неблагоприятным условиям по сравнению с биомассой без фугата. Иммобилизация фугата на торфоносителе (адсорбционное смешивание и высушивание фугата с торфом) создает дополнительную устойчивость к ингибиторам и является условием для хранения и транспортировки внеклеточного ферментного комплекса.

За счет устойчивости к неблагоприятным экологическим факторам (под неблагоприятными экологическими факторами подразумеваются низкая температура, повышенная влажность, криоморфные почвы и т.д.) внеклеточной ферментативной активности фугат позволяет осуществлять деструкцию нефтяных углеводородов в почве, в то время как для микробной массы, являющейся основой биопрепаратов, данные экологические факторы отрицательны.

Штаммы микроорганизмов получены путем их выделения из нефтезагрязненных почв на питательной среде Чапека, следующего состава: сахароза - 30 г, агар - 20 г, NaNO_3 - 5,0 г, MgSO_4 - 0,5 г, KCl - 0,5 г, KH_2PO_4 - 3,0 г.

Штаммы дрожжей *Rhodotorula glutinis* 55-1-Р, *Rhodotorula glutinis* У5-Ус №26 и штамм бактерий *Rhodococcus eqvi* 34-1(28-99/2) депонированы в НИИ "Коллекция культур микроорганизмов" ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор". Регистрационный номер: У-1113, У-1114, fill 15, соответственно.

Источник выделения штамма дрожжей *Rhodotorula glutinis* 55-1-Р: нефтезагрязненные почвы Усинского района Республики Коми Возейского нефтяного месторождений, 1999 год. Колонии ярко-розовые, выпуклые, гладкие, блестящие слизистые, край ровный. Клетки овальные, 3-7 X 4 - 15 мкм, почкование полярное.

Источник выделения штамма *Rhodotorula glutinis* У5-Ус №26: нефтезагрязненные почвы Усинского района Республики Коми СКВ. 203 Верхневозейского нефтяного месторождения, 1995 год. Колонии ярко-розовые, выпуклые, гладкие, блестящие слизистые, край ровный. Клетки овалы, 3-7 X 4-15 мкм, почкование полярное.

Источник выделения штамма бактерий *Rhodococcus eqvi* 34-1(28-99/2): нефтезагрязненные почвы Усинского и Возейского месторождений Республики Коми, почвы свежих и старых нефтеразливов. Колонии на питательном агаре круглые, выпуклые, до 5 мм в диаметре, гладкие, блестящие, кремового цвета, с возрастом - бледно-розовые; клетки по жизненному циклу - палочки-кокки.

Способ получения фугата включает:

- совместное нарабатывание культур микроорганизмов: *Rhodotorula glutinis* 55-1-Р, *Rhodotorula glutinis* У5-Ус №26, *Rhodococcus eqvi* 34-1(28-99/2), выделенных из загрязненных нефтью почв, в колбах на 100 мл на среде Чапека с добавлением нефти,

в течение 3 суток, в соотношении 1:1:1;

- получение фугата путем разделения совместно наработанных культур микроорганизмов: *Rhodotorula glutinis* 55-1-Р, *Rhodotorula glutinis* У5-Ус №26, *Rhodococcus equi* 34-1(28-99/2), методом центрифугирования на микробную массу и самого фугата при 2,7 тысяч оборотов в минуту в течение 8-10 минут (наработанные совместно культуры микроорганизмов разливаются по пробиркам и разделяются на центрифуге на осадок-микробную массу и культуральную жидкость - фугат);

- иммобилизация фугата на торфоносителе (адсорбционное смешивание фугата и торфа из расчета $1 \text{ см}^2 \times 100 \text{ см}^2$ (15 г на 1 кг) с последующим высушиванием).

В лаборатории Института был апробирован способ изготовлению фугата, включающий следующие этапы:

Этап 1. Совместное нарабатывание культур микроорганизмов: *Rhodotorula glutinis* 65-1-Р, *Rhodotorula glutinis* У5-Ус №26, *Rhodococcus equi* 34-1(28-99/2), выделенных из загрязненных нефтью почв, в колбах на 100 мл на среде Чапека с добавлением нефти, в течение 3 суток:

- культуры микроорганизмов были внесены на жидкую среду Чапека бактериологической петлей в соотношении 1:1:1 по 10 мкл при комнатной температуре в стерильных условиях;

- нефть добавлена в колбы в качестве дополнительного источника питания в количестве 0,5 мл;

- нарабатывание биомассы культур микроорганизмов проводили на термостатированной установке выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250 при температуре 30°C и 180 оборотов в минуту в течение 3 суток.

Этап 2. Получение фугата центрифугированием культуральной жидкости с микробной массой:

- совместно наработанную в течение 3 суток биомассу микроорганизмов разливали в центрифужные пробирки, ставили в центрифугу ЭЛЕКОН ЦЛМН-Р10-02 и проводили разделение биомассы при 2,7 тысяч оборотов в минуту в течение 8-10 минут на фугат и микробную массу;

- отделение фугата (надосадочная жидкость в центрифужной пробирке) от микробной массы (осадок в центрифужной пробирке) проводили в стерильном боксе путем слива фугата в стерильную пробирку. На дне центрифужной пробирки оставались осевшие клетки микробной массы.

Этап 3. Иммобилизация фугата адсорбционным связыванием с торфоносителем:

- Фугат был влит в торф, при постоянном перемешивании из расчета $1 \text{ см}^2 \times 100 \text{ см}^2$ (15 г фугата на 1 кг торфа). Характеристика торфа представлена в таблице 1:

Агрохимические характеристики торфа							Таблица 1
	рН	P ₂ O ₅ , мг/100 г	K ₂ O, мг/100 г	Ca, мг/экв 100 г	Mg, мг/экв 100 г	N,%	C,%
торф	2.8	22.4±4.5	29.5±4.4	51.3±3.8	6.61±0.5	0.9±0.14	15.8±1.6

- Высушивание торфа происходило при комнатной температуре T=21-23°C до воздушно-сухого состояния.

В условиях лаборатории были проведены испытания изготовленного фугата, иммобилизованного на торфоносителе с целью оптимизации процесса деградации нефти на загрязненных почвенных субстратах. Иммобилизованный на торфе фугат вносили в почвенные субстраты, определяли степень деструкции углеводов нефти спустя через определенные интервалы времени. Использовали фугат композиции

микроорганизмов *Rhodotorula glutinis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, взятых при соотношении 1:1:1, совместно наработанных. Для сравнения испытывали соответствующую микробную массу. В качестве объектов исследования использовали

песчаный, глинистый и торфяной субстраты, нефть в концентрации 50 и 150 мг/г.

Опытные субстраты загрязняли нефтью. На загрязненные субстраты (таблица 2) вносили фугат, иммобилизованный на торфе из расчета $1 \text{ см} \times 100 \text{ см}^2$ (15 г/кг), и (для сравнения) микробную массу с титром клеток в рабочем растворе $1,2 \cdot 10^9$ (раствор вносили по 5 мл/кг воздушно-сухого субстрата). Дополнительно вносили минеральное удобрение - АЗФК (N16P16K16) из

расчета 350 кг/га (35 г/1000 см^2) в виде водного раствора, N_M из расчета 100 кг/га (10 г/1000 см^2). Сразу были отобраны пробы на анализы: ферментативную активность (каталазную, дегидрогеназную, липазную), интенсивность CO_2 , остаточное

содержание нефтепродуктов в почве. В дальнейшем на анализы пробы отбирали через 3 дня после начала опыта, через 15 дней, 30 дней и 6 месяцев. Результаты исследований, представленные в таблице 1, взяты из исходных и конечных параметров. Окислительно-восстановительные ферменты - дегидрогеназа и каталаза относятся к

почвенным ферментам, наиболее чувствительным к нефтяному загрязнению, и их активность в значительной степени отражает уровень деструкции нефтепродуктов в почве. Действие липаз направлено на расщепление сложноэфирной связи между глицерином и высокомолекулярными жирными кислотами с образованием свободных

жирных кислот, ди- и моноглицеридов и глицерина. Изменение липазной активности связано с накоплением малоактивных и неразлагающихся биологических веществ, образующихся в процессе биodeградации нефти, а также с тем, что в деградации липидов участвуют ферментные системы, очень схожие с системами биodeградации нефти.

В самоочищающихся нефтезагрязненных субстратах происходит незначительное

изменение ферментативной активности к концу эксперимента. В основном наблюдается снижение каталазной, дегидрогеназной и липазной активности. Внесение в нефтезагрязненные субстраты как фугата с минеральными удобрениями, так и микробной массы усиливает биохимические процессы. В глинистом и песчаном субстратах повышается дыхательная активность в вариантах с внесением фугата. В таблице 1 приведены результаты эксперимента и сравнительного анализа. Приняты следующие условные обозначения - Контроль - почва, незагрязненная нефтью и необработанная фугатом и микробной массой, 1 - загрязненная нефтью

почва без обработки фугатом и микробной массой, 2 - загрязненная почва + фугат на торфоносителе и минеральное удобрение, 3 - загрязненная почва + микробная масса и минеральное удобрение, I - исходные данные (ферментативная активность, интенсивность выделения CO_2 в начале опыта), II - конечные данные (ферментативная

активность, интенсивность выделения CO_2 спустя 6 месяцев после постановки опыта). Как видно из таблицы 1, к концу эксперимента в субстратах происходит заметное снижение уровня нефтяного загрязнения (10-40%) как с внесением фугата, так и с внесением микробной массы.

Песчаный субстрат в отличие от глинистого и торфяного характеризуется пониженной биологической активностью, низким содержанием биогенных элементов, т.е. экологически наиболее неблагоприятный для очистки от нефтепродуктов. Внесение нефти усиливает липолитические процессы и процессы дегидрирования, но степень очистки в загрязненном субстрате спустя 6 месяцев низкая. Внесение

микробной массы или фугата повышает биохимическую активность. При внесении фугата усиливается интенсивность выделения CO₂. Наибольшая степень очистки в песчаном субстрате в варианте с внесением фугата.

Таблица 2

5

Изменение ферментативной, дыхательной активности и убыль нефти в нефтезагрязненных и очищаемых почвенных субстратах

Вариант	Начальная концентрация загрязнения, мг/г	pH	каталазная активность, мл KMnO ₄		дегидрогеназная активность, мг формазана		липазная активность, мл 0,1 н KOH		интенсивность выделения CO ₂ , нмоль CO ₂ /1 г в.с.п. час		Убыль нефти, %		
			I	II	I	II	I	II	I	II			
			Глина	контроль	0,46	6,03	0,61	0,64	0,2	0,18		0,4	0,43
10	1	50,0	5,99	0,6	0,5	0,5	0,62	0,08	0,1	2,2	56,29	7	
		150,0	5,81	0,62	0,5	0,78	0,96	0,36	0,03	47,5	43,13	4	
	2	50,0	5,99	0,49	0,64	0,56	1,62	0,3	0,13	125,6	189,2	22	
		150,0	5,81	0,59	1,4	1,4	2,7	0,01	0,21	142,9	163,18	17	
	3	50,0	5,99	0,57	0,6	1,2	1,4	0,08	0,12	108,6	97,67	37	
		150,0	5,81	0,75	1,1	1,2	2,7	0,7	0,2	81,4	14,69	30	
15	Песок	контроль	0,1	5,2	0,23	0,26	0,04	0,08	0,08	0,1	91,9	1,89	-
			50,0	4,94	0,1	0,2	0,8	0,67	0,6	0,38	84,7	92,82	5
	150,0	4,69	0,17	0,13	0,92	1,07	0,45	0,5	255,5	17,57	2		
	2	50,0	4,94	0,07	1,34	1,08	0,89	0,7	0,29	70,1	82,2	31	
		150,0	4,69	0,069	1,2	1,3	0,79	0,29	0,25	7,6	78,5	25	
	3	50,0	4,94	0,44	2,4	0,85	1,2	0,16	0,42	308,1	182,15	15	
150,0		4,69	0,12	0,8	0,55	1,8	0,01	0,5	211,4	37,77	10		
20	Торф	контроль	0,34	2,83	0,19	0,4	0,19	0,18	0,28	0,3	130,4	308,67	-
			150,0	3,13	0,36	0,35	0,67	0,52	0,1	0,4	243,6	287,23	9
			150,0	3,47	0,46	0,82	0,46	0,48	0,05	0,18	550,8	66,25	24
			150,0	3,47	0,49	1,1	0,75	0,8	0,2	0,12	306,8	203,52	40

25

Таким образом, за счет устойчивости к неблагоприятным экологическим факторам биодеструктор нефтяного загрязнения позволяет активизировать процессы разложения нефти в почве при высоком уровне нефтяной нагрузки и при низкой температуре окружающей среды, даже в тех ситуациях, когда активность микробного разрушения нефти минимизирована этими факторами. Препарат позволяет изменить состав и структуру нефтяного загрязнения и сделать его более доступным для микробной атаки. Конкурентными преимуществами продукта является доступность и дешевизна в изготовлении, основанными на использовании отходов производств и доступном для северных условий торфоносителе.

35

Формула изобретения

40

Препарат для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов, содержащий биодеструктор нефтяного загрязнения, представляющий собой фугат культуральной жидкости микробной массы консорциума нефтеокисляющих микроорганизмов, иммобилизованный на торфоносителе, причем в состав консорциума входят: штамм бактерий *Rhodococcus equi* НИИ КKM В-1115, штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* НИИ КKM Y-1114 и штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* НИИ КKM Y-1113, взятые при соотношении 1:1:1 соответственно, выращенные совместно.

45

50