



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2011118088/10, 04.05.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
04.05.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.05.2011

(45) Опубликовано: 27.10.2012 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2384616 C2, 20.03.2010. **ШАРАПОВА И.Э. Микробиологическая активность нефтезагрязненных почвенных субстратов при очистке с применением комплексных биосорбентов. Известия Самарского научного центра РАН, 2010, т.12, №1 (5), с.1245-1249. UA 8134 A1, 26.12.1995. SU 1000420 A1, 28.02.1983. RU 2120418 C1, 20.10.1998.**

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул.  
Коммунистическая, 24, Коми НЦ УрО РАН,  
патентно-лицензионный отдел

(72) Автор(ы):

**Шарапова Ирина Эдмундовна (RU),  
Маркарова Мария Юрьевна (RU),  
Гарабаджиу Александр Васильевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

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

**(54) БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДНЫХ СРЕД ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен биопрепарат для очистки водных сред от нефти и нефтепродуктов. Биопрепарат представляет собой консорциум культур микроорганизмов, включающий биомассу культур бактерий *Rhodococcus equi* P-72-00, дрожжевого

гриба *Rhodotorula glutinis* 2-4 М, мицелиального гриба *Trichoderma lignorum* ВКПМ F-98 и микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. Биопрепарат позволяет производить эффективную очистку окружающей среды от нефтепродуктов как в нефтяной пленке, так и в толще воды. 1 табл., 2 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C02F 3/34* (2006.01)  
*C12N 1/26* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011118088/10, 04.05.2011**

(24) Effective date for property rights:  
**04.05.2011**

Priority:

(22) Date of filing: **04.05.2011**

(45) Date of publication: **27.10.2012 Bull. 30**

Mail address:

**167982, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja, 24,  
Komi NTs UrO RAN, patentno-litsenzionnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Sharapova Irina Ehdmundovna (RU),  
Markarova Marija Jur'evna (RU),  
Garabadzhiu Aleksandr Vasil'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

**(54) BIOPREPARATION FOR CLEANING AQUATIC MEDIA FROM OIL AND OIL PRODUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology.  
A biopreparation for cleaning aquatic media from oil and oil products is disclosed. The biopreparation is a consortium of cultures of microorganisms including biomass of cultures of bacteria *Rhodococcus equi* P-

72-00, yeast fungus *Rhodotorula glutinis* 2-4 M, micellar fungus *Trichoderma lignorum* VKPM F-98 and microalgae *Chlorella vulgaris* Beijer.

EFFECT: biopreparation enables efficient cleaning of the environment from oil products, both in the oil film and in the water.

1 tbl, 2 ex

Изобретение относится к биотехнологии и экологии и может быть использовано при ликвидации нефтяных загрязнений в местах разливов нефти и нефтепродуктов при добыче, транспортировке и хранении, в том числе в заболоченных районах Севера.

В настоящее время для ликвидации загрязнений нефтепродуктами успешно применяют биологические методы. Используемые биопрепараты включают различные нефтеокисляющие микроорганизмы - бактерии и реже грибы.

Известен биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов «Нафтокс» (патент RU 2053206, МПК В09С 1/10), включающий нефтеокисляющие бактерии, нормальные парафины С12-С18, щавелевокислый аммоний и воду. Недостатком данного биопрепарата является его невысокая эффективность при очистке от нефти и дизельного топлива, а также биопрепарат рекомендуется использовать при оптимальной температуре в поверхностном слое воды не ниже 20°С и при спокойной воде.

Известен биопрепарат «Родер» для очистки почв, почвогрунтов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов (патент RU 2174496, МПК С02F 3/34, В09С 1/10) на основе R-диссоциантов штаммов *Rhodococcus rubber* ВКМ Ас-1513Д и *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-1514Д, выращиваемых на средах с высоким содержанием морской соли. Недостатком данного биопрепарата является наличие в консорциуме штаммов только прокариотических микроорганизмов (бактерий), что сужает возможности при очистке окружающей среды от углеводов.

Наиболее близким к заявляемому является биопрепарат для очистки окружающей среды от углеводов (патент RU 2384616, МПК С12N 1/26, С02F 3/34), состоящий из консорциума штаммов микроорганизмов бактерий *Rhodococcus* sp. ВКПМ АС-1258 и дрожжей *Candida* sp. ВСБ-616. Недостатком биопрепарата является недостаточная эффективность при очистке от высоких концентраций нефти и водорастворимых углеводов (утилизация объемного 1% нефти).

Техническим результатом настоящего изобретения является создание биопрепарата, представляющего собой консорциум микроорганизмов, который эффективно очищает объекты окружающей среды от нефти и водорастворимых нефтепродуктов при повышенной их концентрации.

Технический результат достигается тем, что биопрепарат представляет собой консорциум микроорганизмов, включающий биомассу культур бактерий *Rhodococcus equi* Р-72-00, дрожжевого гриба *Rhodotorula glutinis* 2-4 М и мицелиального гриба *Trichoderma lignorum* F-98, а также микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer.

Преимуществом предлагаемого биопрепарата является объединение биомассы бактериальной культуры, дрожжевой культуры и мицелиального гриба, а также культуры микроводорослей. При этом в консорциуме при биодеструкции участвуют активные микроорганизмы-нефтедеструкторы (дрожжи и бактерии), микроорганизмы (микроводоросли), адаптированные к водным условиям, устойчивые к токсическому воздействию и способствующие биодеструкции углеводов в воде, и микроорганизмы (мицелиальный гриб), проявляющие устойчивость и нефтедеструктивную активность к углеводам только в композиции, но повышающие эффективность биодеструкции биопрепарата в целом.

Используемые культуры микроорганизмов: бактериальная - штамм *Rhodococcus equi* Р-72-00, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» под регистрационным номером В-1117 (справка о депонировании №2705 от 18.11.2005); дрожжевая - штамм дрожжевого гриба *Rhodotorula glutinis* 2-4 М, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» под регистрационным номером У-1112 (справка о депонировании №2205

от 18.11.2005); грибная культура - штамм мицелиального гриба *Trichoderma lignorum* F-98 (синоним *Trichoderma viride* F-98) с паспортом ВКПМ (Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов); культура зеленых микроводорослей - *Chlorella vulgaris* Beijer находятся в лаборатории Радиоэкологии Института биологии Коми научного центра УрО РАН. Микроорганизмы, входящие в биопрепарат, и их консорциумы характеризуются как экологически нетоксичные.

Используемые культуры бактерий *Rhodococcus equi* и дрожжей *Rhodotorula glutinis* избирательны в отношении биodeградации углеводов разных классов (Маганов, Маркарова, Муляк и др., 2006: Природоохранные работы на предприятиях нефтегазового комплекса. Часть 1. Рекультивация загрязненных нефтью земель в Усинском районе Республики Коми. - Сыктывкар, 2006. - 208 с.). Бактерии рода *Rhodococcus* относятся к липофильным микроорганизмам, которые за счет выработки биосурфактантов (поверхностно-активных веществ) способны развиваться непосредственно в нефтяной пленке. Дрожжевой гриб *Rhodotorula glutinis* имеет отличный от бактериального путь ферментативной биodeградации углеводов, поэтому в сочетании с бактериальной культурой более полно разлагает нефтяные углеводороды. Используемая термофильная культура одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer отличается очень высокой экологической пластичностью к антропогенным факторам (перепадам pH, температур и содержанию минеральных солей в воде), выполняет функцию ассимиляции кислорода в зону окисления углеводов, применяется в ассоциации микроорганизмов, т.к. культура наиболее адаптирована к стрессовым условиям водного загрязнения. Используемый штамм *Trichoderma lignorum* F-98 (синоним *Trichoderma viride* F-98) относится к целлюлозолитическим микромицетам, но при абсорбционном способе питания именно в сочетании с бактериальной культурой проявляет нефтеструктурную активность, являясь матрицей для бактериальных клеток.

Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические характеристики микроорганизмов обоснованы паспортными и идентификационными данными.

Каждую культуру консорциума штаммов микроорганизмов получают и хранят отдельно. Соотношение различных микроорганизмов определяется в зависимости от вида загрязнения и способа применения (температура, pH окружающей среды и др.). Концентрация жизнеспособных аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов в биопрепарате не менее  $5 \cdot 10^7$ - $10^9$  кл/мл достаточна для его эффективного применения. Расход смешанного биопрепарата зависит от концентрации загрязняющих веществ, в частности, расходуется не менее 10 л препарата на тонну очищаемой нефтезагрязненной воды при нефтезагрязнении 3% от объема воды, что соответствует 20 кг нефти/1 т воды.

Пример 1. Получение биопрепарата.

Монокультуры аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов накапливали глубинным культивированием на индивидуальной питательной среде при контроле и соблюдении оптимальных параметров культивирования.

Среда Чапека (*Rhodococcus equi* P-72-00): 10,0 г сахарозы;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0;  $\text{NaNO}_3$  3,0;  $\text{KCl}$  0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01; 0,5% ДТ.

Среда Ридер (*Rhodotorula glutinis* 2-4 М): 10,0 г сахарозы;  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  3,0 г;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,7 г;  $\text{NaCl}$  0,5 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1 г;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,4 г; 0,5% ДТ.

Среда Кнопа (*Trichoderma lignorum* F-98): 10,0 г сахарозы,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,44;  $\text{KNO}_3$  0,25;  $\text{KCl}$  0,12;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,51; 0,5% ДТ.

Среда Тамия (*Chlorella vulgaris* Beijer) г/л: KNO<sub>3</sub> 5,0; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 2,5; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O - 1,25; FeSO<sub>4</sub> - 0,003 (при естественном освещении).

Биопрепараты бактериальный, дрожжевой и грибной после глубинного культивирования на индивидуальной для каждой культуры комбинированной (углеводно-углеводородной) питательной среде содержат монокультуры в концентрации не менее 1-10<sup>10</sup> КОЕ/мл или биомассу микроорганизмов 3-6 г/л. Накопительную культуру зеленых водорослей *Chlorella vulgaris* Beijer получали культивированием простым и малозатратным способом на среде Тамия при естественном освещении или по методике (Григорьев Ю.С., Андреев А.А. «Устройство для выращивания микроводорослей». Патент №2165973), концентрировали центрифугированием при 2000 об/мин с показателями по биомассе не менее 3 г/л.

Пример 2. Испытание биопрепарата.

В колбы заливают минеральную среду Раймонда следующего состава: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1; CaCl<sub>2</sub>×6 H<sub>2</sub>O 0,01; MnSO<sub>4</sub> X 7 H<sub>2</sub>O - 0,02; FeSO<sub>4</sub> 0.01; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> 1,5; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> 1,0; MgSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O 0,2; NH<sub>4</sub>Cl 2,0; NaCl 5,0, рН 6,5. В качестве единственного источника углерода добавляют нефть (использовали тяжелую нефть, с высоким содержанием парафинов и смолисто-асфальтовых веществ Воезского месторождения Усинского района Республики Коми) в количестве 3 об.% (20 г/л). По вариантам добавляют накопительные культуры микроорганизмов из расчета, чтобы общее количество вносимого биопрепарата при соотношении монокультур не более 2 об.% (0,1 г сухого вещества) с исходным титром от 10<sup>7</sup> до 10<sup>9</sup>. Колбы в динамичных условиях (при 220 об/мин и температуре 25°С) наблюдаются в течение 10 суток.

В таблице представлено снижение концентрации нефтепродуктов (по отношению к исходному содержанию нефти) и накопление биомассы и общей микробной численности (ОМЧ по количеству колониеобразующих единиц КОЕ/мл) накопительных монокультур в минеральной среде Раймонда, загрязненной нефтью из расчета 20 г/л воды, где в качестве единственного источника питания и энергии использованы нефтяные углеводороды (НУГВ).

№	Исследуемые культуры микроорганизмов	10 сутки				
		0 сутки ОМЧ, КОЕ/1мл	1 сутки ОМЧ КОЕ/1мл	ОМЧ КОЕ/1мл	Биомасса г/л	Снижение остаточного содержания нефтепро- дуктов в воде, %
1	<i>Rhodococcus egvi</i> P-72-00	5,6*10 <sup>2</sup>	3*10 <sup>6</sup>	1,5*10 <sup>10</sup>	1,98±0,05	25,5
2	<i>Rhodotorula glutinis</i> 2-4 M	1*10 <sup>3</sup>	1,2*10 <sup>4</sup>	2,6*10 <sup>9</sup>	1,12±0,05	18,6
3	<i>Rhodococcus egvi</i> P-72-00+ <i>Rhodotorula glutinis</i> 2-4 M	2,5*10 <sup>3</sup>	6,5*10 <sup>4</sup>	1,8*10 <sup>9</sup>	1,62±0,05	27,3
4	<i>Rhodococcus egvi</i> P-72-00 + <i>Trichoderma lignorum</i> F 98	6,5*10 <sup>3</sup>	1,3*10 <sup>4</sup>	5,2*10 <sup>11</sup>	3,15±0,06	31,8
5	<i>Rhodococcus egvi</i> P-72-00+ <i>Rhodotorula glutinis</i> 2-4 M + <i>T.lignorum</i> F98	1*10 <sup>3</sup>	1*10 <sup>4</sup>	2,8*10 <sup>10</sup>	2,41±0,05	36,1
6	<i>Rhodococcus egvi</i> P-72-00+ <i>Rhodotorula glutinis</i> 2-4 M + <i>T.lignorum</i> F98+ <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i> Beijer.	1,8*10 <sup>3</sup>	6,2*10 <sup>4</sup>	4,7*10 <sup>12</sup>	3,8±0,06	42,4

Наилучшие результаты по снижению в вариантах 6 и 4, 5, но по внешним данным в колбе с бактериально-грибной ассоциацией (вариант 4) на стенках колбы и в воде не было нефтяной пленки. Образовался конгломерат из биомассы мицелия и бактерий бурого цвета (гриб сорбировал нефть и являлся матрицей для бактерий, которые находились и в воде, и на грибном мицелии). В 6 варианте с четырьмя культурами принудительного освещения оказалось достаточно для развития водорослей и более полного разложения нефти консорциумом микроорганизмов.

Представленные данные показывают высокую эффективность биопрепарата, составленного из 4 монокультур, относящихся к различным таксономическим группам микроорганизмов. Сочетание бактериальной и дрожжевой монокультур, являющихся высокоактивными нефтедеструкторами, с мицелиальным грибом и зелеными микроводорослями, относящимися к устойчивым к нефтяным углеводородам микроорганизмам, является особенностью данного биопрепарата и проявляется способностью к соокислению нефтяных углеводородов в ассоциации микроорганизмов и высокой жизнеспособностью данного консорциума микроорганизмов.

#### Формула изобретения

Биопрепарат для очистки водных сред от нефти и нефтепродуктов, представляющий собой консорциум культур микроорганизмов, включающий биомассу культур бактерий *Rhodococcus equi* P-72-00, дрожжевого гриба *Rhodotorula glutinis* 2-4 М, мицелиального гриба *Trichoderma lignorum* ВКПМ F-98 и микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer.