



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C02F 3/34 (2006.01)

B09C 1/10 (2006.01)

B01J 20/24 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C02F 3/341 (2022.08); B09C 1/10 (2022.08); B01J 20/24 (2022.08); C12N 1/20 (2022.08); C12N 1/38 (2022.08); C12R 2001/01 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022117547, 27.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.06.2022

Дата регистрации:
06.03.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.06.2022

(45) Опубликовано: 06.03.2023 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

300012, г. Тула, пр. Ленина, 92, Федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования "Тульский
государственный университет" (ТулГУ),
патентно-лицензионный отдел

(72) Автор(ы):

Дмитриева Елена Дмитриевна (RU),
Герцен Мария Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Тульский государственный
университет" (ТулГУ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2174496 C2, 10.10.2001. RU
2604788 C1, 10.12.2016. RU 2312891 C1,
20.12.2007. RU 2378060 C2, 10.01.2010. CN
107988096 A, 04.05.2018. ДМИТРИЕВА Е.Д. и
др. Влияние гуминовых кислот на состояние
капель нефтепродуктов в присутствии
микроорганизмов-нефтедеструкторов рода
Rhodococcus. Вестник Тверского
государственного университета. Серия
"Химия", (см. прод.)

(54) Биоконпозиция на основе гуминовых кислот тростникового низинного торфа

(57) Реферат:

Изобретение может быть использовано в технологиях очистки от нефтяного загрязнения водных акваторий (пресных и морских), почвенных сред (песчаный грунт, различные типы нефтезагрязненных почв, галька); щебня и балластного слоя железнодорожного пути при ликвидации разливов нефтепродуктов (мазут, топливо, смазочные материалы) в различных климатических зонах. Биоконпозиция для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов состоит из раствора гуминовых кислот тростникового низинного торфа концентрацией 50 мг/л и суспензии из микроорганизмов-нефтедеструкторов рода Rhodococcus штаммов Rhodococcus erythropolis S67 и Rhodococcus erythropolis X5 в концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл, причем микроорганизмы-нефтедеструкторы рода

Rhodococcus взяты в виде ассоциации в соотношении штаммов Rhodococcus erythropolis S67 и Rhodococcus erythropolis X5 1:1, а соотношение суспензия ассоциации микроорганизмов:гуминовые кислоты тростникового низинного торфа составляет 5:3 по объему. Обеспечивается улучшение солюбилизирующей и эмульгирующей способности гуминсодержащих продуктов на основе торфа за счет образования активной биопленки с микроорганизмами-нефтедеструкторами рода Rhodococcus, что сопровождается увеличением биологической активности и повышением детоксицирующих свойств по отношению к нефти и нефтепродуктам. Биоконпозиция способна деградировать нефть и нефтепродукты в диапазоне солёности 1-10%

(оптимальная соленость 3-7%) и температур 10-35°C (оптимальная температура 22-26°C). 2 ил., 2 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

2021, N2 (44), с. 69-79. ДМИТРИЕВА Е.Д. и др. Влияние гуминовых веществ торфов на ростовые параметры микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* в присутствии гексадекана. Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. Том 4 (70), 2018, N 2, с. 43-56.

R U 2 7 9 1 2 3 7 C 1

R U 2 7 9 1 2 3 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C02F 3/34 (2006.01)

B09C 1/10 (2006.01)

B01J 20/24 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C02F 3/341 (2022.08); B09C 1/10 (2022.08); B01J 20/24 (2022.08); C12N 1/20 (2022.08); C12N 1/38 (2022.08); C12R 2001/01 (2022.08)

(21)(22) Application: 2022117547, 27.06.2022

(24) Effective date for property rights:
27.06.2022

Registration date:
06.03.2023

Priority:

(22) Date of filing: 27.06.2022

(45) Date of publication: 06.03.2023 Bull. № 7

Mail address:

300012, g. Tula, pr. Lenina, 92, Federalnoe
gosudarstvennoe byudzhethnoe obrazovatelnoe
uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Tulskij
gosudarstvennyj universitet" (TulGU), patentno-
litsenzionnyj otdel

(72) Inventor(s):

Dmitrieva Elena Dmitrievna (RU),
Gertsen Mariya Mikhajlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Tulskij gosudarstvennyj
universitet" (TulGU) (RU)

(54) BIOCOMPOSITION BASED ON HUMIC ACIDS OF REED LOWLAND PEAT

(57) Abstract:

FIELD: water areas cleaning.

SUBSTANCE: invention can be used in technologies for cleaning water areas (fresh and marine) from oil pollution, soil media (sandy soil, various types of oil-contaminated soils, pebbles); crushed stone and ballast layer of the railway track during the liquidation of spills of oil products (fuel oil, fuel, lubricants) in various climatic zones. The biocomposition for cleaning soil and water from oil and oil products consists of a solution of humic acids of cane lowland peat with a concentration of 50 mg/l and a suspension of oil-degrading microorganisms of the genus *Rhodococcus* strains *Rhodococcus erythropolis* S67 and *Rhodococcus erythropolis* X5 at a concentration of 10^5 - 10^6 CFU/ml, and microorganisms -oil destructors of the genus

Rhodococcus are taken as an association in the ratio of *Rhodococcus erythropolis* S67 and *Rhodococcus erythropolis* X5 strains 1:1, and the ratio of the suspension of the association of microorganisms: humic acids of cane lowland peat is 5:3 by volume.

EFFECT: improved solubilizing and emulsifying ability of peat-based humic products due to the formation of an active biofilm with oil-degrading microorganisms of the genus *Rhodococcus*, which is accompanied by an increase in biological activity and an increase in detoxifying properties in relation to oil and oil products. The biocomposition is able to degrade oil and oil products in the salinity range of 1-10% (optimal salinity 3-7%) and temperatures 10-35°C (optimal temperature 22-26°C).

1 cl, 2 dwg, 2 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области биотехнологии и производства биопрепаратов-нефтедеструкторов, содержащие природные полимеры -гуминовые кислоты торфа и может быть использовано в технологиях очистки от нефтяного загрязнения водных акваторий (пресных и морских), почвенных сред (песчаный грунт, различные типы нефтезагрязненных почв, галька); щебня и балластного слоя железнодорожного пути при ликвидации разливов нефтепродуктов (мазут, топливо, смазочные материалы) в различных климатических зонах.

Известно изобретение, биопрепарат «Родер» для биodeградации нефти и нефтепродуктов в почвах, почвогрунтах, пресных и высокоминерализованных водах, принятое за аналог, представляющее собой штаммы бактерий рода *Rhodococcus*, и содержащее R-формы родококков штаммов *Rhodococcus ruber* ВКМ Ас-1513Д и *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-1514Д, полученные путем селекции R-форм на обедненной питательной среде с концентрацией NaCl 10,0 г/л для биорекультивации загрязненных углеводородами объектов в условиях низкой минерализации или с концентрацией морской соли 30,0-50,0 г/л для биорекультивации в условиях высокой минерализации (Мурыгина В.П., Войшвилло Н.Е., Калюжный С.В. Биопрепарат «Родер» для очистки почв, почвогрунтов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов. Патент РФ МПК⁷ C02 F 3/34, В 09 С 1/10, C12N 1/26 // (C12N 1/26, C12R 1:01), ⁽¹⁹⁾ RU ⁽¹¹⁾2174496 ⁽¹³⁾ C2). Авторы предлагают использовать для биodeградации нефти и нефтепродуктов в почвах, почвогрунтах, пресных и высокоминерализованных водах только R-диссоциантов штаммов *Rhodococcus ruber* ВКМ Ас-1513Д и *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-1514Д, выращиваемых на средах с высоким содержанием морской соли и способных проводить активный процесс расщепления углеводородов нефти и нефтепродуктов в пресной и морской воде, а также в различных почвогрунтах, и создавать условия для рекультивации почв.

Недостатком данного изобретения является отсутствие важных данных о способности микроорганизмов продуцировать биоэмульгаторы и отсутствие в составе биопрепарата органической матрицы, способной дополнительно связывать нефтезагрязнители и оказывать стимулирующее действие на бактерии, входящие в биопрепарат.

Известна биокомпозиция, принятая за прототип (Герцен М.М., Дмитриева Е.Д. Влияние гуминовых кислот на состояние капель нефтепродуктов в присутствии микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus*. // Вестник ТвГУ. - Серия: Химия. - 2021. - №2(44). - С. 69-79.). Признаками биокомпозиции, совпадающими с существенными признаками заявленного изобретения, является органическая часть - полимерный природный матрикс биокомпозиции, представляющая собой гуминовые кислоты тростникового низинного торфа (ТНТ), источник гуминовых кислот, из которого выделены ГК - тростниковый низинный торф, способ выделения полимерного природного матрикса и микроорганизмы рода *Rhodococcus*: штамм *Rhodococcus erythropolis* S67, заявленной биокомпозиции.

Биокомпозиции «Гуминовые кислоты тростникового низинного торфа + *Rhodococcus erythropolis* S67» и «Гуминовые кислоты тростникового низинного торфа + *Rhodococcus erythropolis* X5», принятые за прототип, проявляют солюбилизирующую способность (значения коэффициента пропускания эмульсии нефти и нефтепродуктов в воде не более 50±2% спустя 26 часов), способны через 48 часов применения уменьшать на 30-40% площадь поверхности, занимаемой нефтепродуктами и на 50% - нефти, полная биodeградация нефти и нефтепродуктов происходит спустя 7 суток. Недостатками прототипа являются невысокая биodeградационная способность и продолжительное время полной деградации углеводородов нефти.

На Фиг. 1 представлено влияние биокомпозиции на состояние пленок нефти спустя 2 часа после начала эксперимента (а - комнатная температура (22°C); б - повышенная соленость (3% NaCl); в - пониженная температура (10°C)). На Фиг. 2 представлено влияние биокомпозиции на состояние пленок нефти спустя 48 часов после начала эксперимента (а - комнатная температура (22°C); б - повышенная соленость (3% NaCl); в - пониженная температура (10°C)).

Задача предлагаемого изобретения заключается в интенсификации процесса расщепления нефти и нефтепродуктов в пресной и морской воде, в различных почвенных средах, повышении биodeградационной способности микроорганизмов-нефтедеструкторов, уменьшении времени полной деградации углеводородов нефти и создании условий для рекультивации почв в различных климатических зонах.

В качестве решения поставленной задачи предлагается биокомпозиция для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов на основе гуминовых кислот тростникового низинного торфа, состоящая из раствора гуминовых кислот тростникового низинного торфа концентрацией 50 мг/л, суспензии из микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5, в концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл, микроорганизмы-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* взяты в виде ассоциации в соотношении штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5 1:1, а соотношение суспензия ассоциации микроорганизмов : гуминовые кислоты тростникового низинного торфа составляет 5:3 (по объему).

Заявленную биокомпозицию получается следующим образом:

Природную органическую матрицу биокомпозиции получают: навеску тростникового низинного торфа (ТНТ) обрабатывают 0,1н NaOH в соотношении торф: щелочь - 1:6, смесь кипятят в течение 2 часов при постоянном перемешивании и оставляют на сутки. Полученный раствор гумата натрия отделяют фильтрованием и подкисляют 5%-ным раствором HCl до pH=2±1. Осадок гуминовых кислот (ГК) отделяют центрифугированием в течение 20 минут при 800 об/мин и промывают дистиллированной водой до нейтрального значения среды (pH=7). Очистку ГК от низкомолекулярных примесей осуществляют путем диализа против дистиллированной воды до отрицательной реакции промывных вод на Cl⁻ по AgNO₃ в мембранных мешках с размером пор 12-14 кДа. Длительность диализа - 24 часа. Очищенный препарат гуминовых кислот сушат в сушильном шкафу при t=60°C.

Для повышения биodeградационной способности биокомпозиции к гуминовым кислотам тростникового низинного торфа, концентрации 50 мг/л, дополнительно вносят приготовленную суспензию ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* при концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл (в соотношении штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 : *Rhodococcus erythropolis* X5=1:1 по объему), а соотношение суспензия ассоциации микроорганизмов: ГК составляет 5:3 (по объему). Масштабирование микроорганизмов проводили в жидких питательных средах в качалочных колбах на 100 мл в среде Эванса, в которую дополнительно вносили 2% н-гексадекана. Микроорганизмы культивировали в орбитальной качалке Excella E25 при 180 об/мин при 37°C в течение шести суток.

Биокомпозиция на основе гуминовых кислот тростникового низинного торфа представляет собой раствор коричневого цвета. Биокомпозиция способна деградировать нефть и нефтепродукты в диапазоне солености (1-10%) (оптимальная соленость 3-7%) и температур (10-35°C) (оптимальная температура 22-26°C). Предлагаемая биокомпозиция характеризуется повышенной биodeградационной и эмульгирующей

способностью по отношению к нефти и нефтепродуктам. Применение биокомпозиции на основе гуминовых кислот ТНТ и ассоциации бактерий рода *Rhodococcus* (штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5) снижает время необходимое для полной деструкции нефти и нефтепродуктов до 48 часов в водных средах (пресных и соленых) и при пониженной температуре (10°C).

Принцип работы изобретения заключается в следующем:

Биокомпозиция на основе гуминовых кислот тростникового низинного торфа проявляет повышенную биodeградебельность углеводородов нефти за счет синергизма действия бактерий-нефтедеструкторов и гуминовых кислот в условиях нефтяного загрязнения. Микроорганизмы окисляют углеводородные соединения, растворяя или их эмульгируя посредством выделения биосурфактантов. Гуминовые кислоты относятся к высокомолекулярными поверхностно-активным веществам и являются эффективными стабилизирующими агентами. Гуминовые кислоты облегчают самопроизвольную адсорбцию микроорганизмов рода *Rhodococcus* на границе раздела нефть - вода, создавая структурно-механический барьер вокруг капель нефтепродуктов, которые начинают тонуть, переводя нефть и нефтепродукты в водную толщу. Мелкие капли углеводородов нефти, окруженные прочной пленкой адсорбционного слоя из молекул ГК и микроорганизмов, не могут сливаться друг с другом и образуют стойкие, трудно расслаивающиеся эмульсии. Высокопрочный структурно-механический барьер вокруг капель нефтепродуктов, образованный гуминовыми кислотами, предотвращает высвобождение углеводородов из состава ассоциатов. Приобретая отрицательную плавучесть капли нефтепродуктов, переходят с поверхности в толщу воды, где интенсивно разлагаются микроорганизмами-нефтедеструкторами из-за большой поверхности контакта.

Пример 1. Влияние биокомпозиции на основе гуминовых кислот тростникового низинного торфа на состояние пленок нефти.

Готовили биокомпозицию, состоящую из суспензии ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* (штаммы *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5) в концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл (в соотношении штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 : *Rhodococcus erythropolis* X5=1:1 по объему) и гуминовых кислот ТНТ (50 мг/л) а соотношение ассоциация микроорганизмов : ГК составляет 5:3 (по объему). На полученную нефтяную пленку вносили предварительно приготовленную биокомпозицию (500 мкл). Состояние пленок нефти оценивали через 2 (Фиг. 1) и 48 (Фиг. 2) часов.

Не зависимо от условий проведения эксперимента спустя 2 часа происходит практически полная деструкция нефтяной пленки биокомпозицией, так на поверхности воды отсутствуют даже мелкие нефтяные капли. Наблюдаются неструктурированные ансамбли, состоящие из гуминовых кислот, остатков солубилизированной нефти и биопленки микроорганизмов. Полная деструкция углеводородов нефти происходит через 48 часов, биодеструкции не подвергается только ароматический каркас гуминовых кислот. Применение предлагаемой биокомпозиции на основе гуминовых кислот ТНТ и ассоциации бактерий рода *Rhodococcus* снижает время необходимое для полной деструкции нефти и нефтепродуктов до 48 часов, что обусловлено образованием и развитием более сложной по структуре биопленки из сообщества штаммов микроорганизмов, позволяющей оптимально использовать все доступные источники питания и энергии (гуминовые кислоты) и обеспечивать лучшую защищенность от воздействия токсикантов.

Пример 2. Ремедиационная способность предлагаемой биокомпозиции в условиях

нефтезагрязненных почв.

Ремедиационная эффективность предлагаемой биоконпозиции, состоящей из суспензии ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* (штаммы *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5) в концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл (в соотношении штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 : *Rhodococcus erythropolis* X5= 1: 1 по объему) и гуминовых кислот ТНТ (50 мг/л), а соотношение ассоциации микроорганизмов : ГК составляет 5:3 (по объему), проанализирована на двух образцах нефтезагрязненных почв с территорий нефтеперерабатывающего завода (НПЗ) и металлургического предприятия. Исходное (Таблица 1) и остаточное (Таблица 2) содержание нефтепродуктов по окончании ремедиационных мероприятий определяли на анализаторе жидкости «Флюорат 02-3М» по методике ПНД Ф 16.1:2.21-98.

По содержанию углеводородов нефти в исходных образцах почва с территории металлургического предприятия по уровню загрязнения соответствует почве с очень высоким уровнем загрязнения (>5000 мг/кг), с территории нефтеперерабатывающего завода - почве с высоким уровнем загрязнения (3000-5000 мг/кг) (Шагидуллин Р.Р. Нормирование допустимого остаточного содержания нефти и продуктов ее трансформации в почвах. / Р.Р. Шагидуллин [и др.] // Георесурсы. - 2011. - №5 (41). - С. 2-5). Для снижения уровня нефтяного загрязнения образцы почв обрабатывали раствором гуминовых кислот тростникового низинного торфа при концентрации 50 мг/л (почва (г): ГК (мл)=10:5) и оставляли на сутки. Затем вносили приготовленную биоконпозицию в соотношении почва (г): биоконпозиция (мл) 10:5. Образцы почв обрабатывали предлагаемой биоконпозицией, внося по 5 мл, дважды с интервалом 5 дней. Эффективность применяемой биотехнологии оценивали спустя 14 суток.

Применение биоконпозиции позволило снизить уровень загрязнения в почве с нефтеперерабатывающего завода на 76% при этом количество нефтепродуктов в образце соответствует допустимому уровню загрязнения. В почве с металлургического предприятия уровень нефтяного загрязнения снижается на 89%, количество нефтепродуктов соответствует низкому уровню загрязнения. Эффективность заявленной биоконпозиции превышает эффективность очистки загрязненного грунта аборигенной микрофлорой (53%) и коммерческого биопрепарата «Родер» (81%).

Компильция в составе биоконпозиции гуминовых кислот тростникового низинного торфа с микроорганизмами-нефтедеструкторами рода *Rhodococcus* путем введения штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5 позволяет увеличить эмульгирующую, солубилизирующую и биодеграционную способность биоконпозиции. Предлагаемый препарат обладает повышенной биодеграционной способностью по отношению к нефти и нефтепродуктам.

Заявленное изобретение может быть использовано в форме водной суспензии с концентрацией гуминовых кислот концентрации 50 мг/л и ассоциации микроорганизмов рода *Rhodococcus* штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5, способных продуцировать биоэмульгаторы, в концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл, взятых в соотношении штаммов *Rhodococcus erythropolis* S67 : *Rhodococcus erythropolis* X5 1:1 (по объему), а соотношение суспензия ассоциации микроорганизмов : гуминовые кислоты составляет 5:3 (по объему) в области охраны окружающей среды и природоохранных технологий, в частности очистки пресных и морских акваторий, а также различных почвенных сред (песчаный грунт, различные типы нефтезагрязненных почв, галька); щебня и балластного слоя железнодорожного пути при ликвидации разливов нефтепродуктов (мазут, топливо, смазочные материалы) в различных климатических зонах.

Технический результат заявляемого решения заключается в улучшении
 солюбилизирующей и эмульгирующей способности гуминсодержащих продуктов на
 основе торфа, за счет образования активной биопленки с микроорганизмами-
 нефтедеструкторами рода *Rhodococcus*, что сопровождается увеличением биологической
 активности и повышением детоксицирующих свойств по отношению к нефти и
 нефтепродуктам.

**Биокомпозиция на основе
 гуминовых кислот тростникового
 низинного торфа**

Таблица 1 – Содержание нефтепродуктов в образцах почв до проведения
 ремедиационных мероприятий

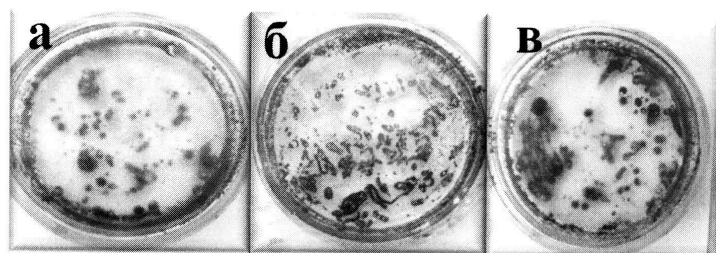
Объект проверки	Содержание нефтепродуктов, мг/кг
Металлургическое предприятие	9180±2300
Нефтеперерабатывающий завод	3321±1162

Таблица 2 – Содержание нефтепродуктов в образцах почв после
 ремедиационных мероприятий

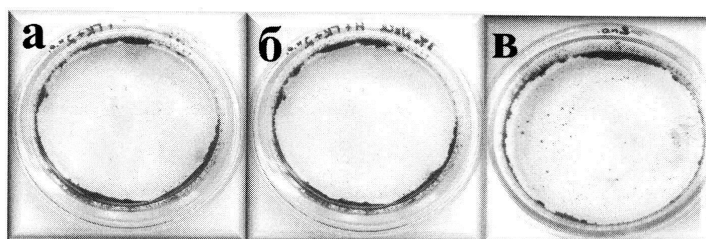
Объект проверки	Содержание нефтепродуктов, мг/кг
Металлургическое предприятие	1030±226
Нефтеперерабатывающий завод	813±98

(57) Формула изобретения

Биокомпозиция для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов на основе
 гуминовых кислот тростникового низинного торфа, состоящая из раствора гуминовых
 кислот тростникового низинного торфа концентрацией 50 мг/л, суспензии из
 микроорганизмов-нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* штаммов *Rhodococcus erythropolis*
S67 и *Rhodococcus erythropolis X5* в концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ/мл, отличающаяся тем,
 что микроорганизмы-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* взяты в виде ассоциации в
 соотношении штаммов *Rhodococcus erythropolis S67* и *Rhodococcus erythropolis X5* 1:1, а
 соотношение суспензия ассоциации микроорганизмов:гуминовые кислоты тростникового
 низинного торфа составляет 5:3 (по объему).



Фиг. 1



Фиг. 2