

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234430**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423511**

(22) Data zgłoszenia: **20.11.2017**

(51) Int.Cl.
C05F 11/02 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)

(54) **Sposób biosolubilizacji węgla brunatnego przy użyciu mikroorganizmu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
03.06.2019 BUP 12/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.02.2020 WUP 02/20

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
BARTOSZ STRZELECKI, Łódź, PL
IRENA ROMANOWSKA, Łódź, PL
STANISŁAW BIELECKI, Łódź, PL
OLGA MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 234430 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób biosolubilizacji (biouplynniania) węgla brunatnego przy użyciu mikroorganizmu, w celu pozyskania nawozu organicznego o wysokiej zawartości kwasów huminowych.

Węgiel brunatny, obok ropy naftowej, gazu ziemnego i węgla kamiennego, jest jednym z najważniejszych źródeł energii w dzisiejszym świecie. Wykorzystuje się go głównie do produkcji ciepła oraz energii elektrycznej. Wykorzystanie węgla brunatnego do produkcji energii elektrycznej nie znajduje pełnej akceptacji na świecie ze względu na wysoką, w porównaniu z innymi paliwami, emisję dwutlenku węgla na jednostkę uzyskanej energii (94,60 kg CO₂/GJ). Dodatkowym czynnikiem dyskwalifikującym użycie węgla brunatnego jako źródła pozyskiwania energii elektrycznej jest wysoka emisja gazów (NO_x i SO_x), metali ciężkich (na przykład Hg) oraz popiołów lotnych, które zanieczyszczają środowisko.

Cechy dyskwalifikujące wykorzystanie węgla brunatnego do produkcji energii sprawiają, że poszukuje się technologii mających na celu przetworzenie węgla brunatnego do innych, nowych i użytecznych produktów, które nie zanieczyszczająby środowiska. Jedną z takich technologii jest proces upłynniania węgla. W wyniku procesu upłynniania węgla powstaje mieszanina różnego rodzaju substancji, głównie kwasów humusowych, które składają się z kwasów huminowych i fulwowych. Dzięki temu produkt upłynniania węgla znajduje zastosowanie jako nawóz lub do immobilizacji i/lub detoksyfikacji agrochemikaliów z ziemi przez ich sorpcję, co zostało opisane w czasopismach: *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, t. 52, s. 2–15, *Biodegradation* 2013, t. 24, s. 305–318 i *Fuel* 2013, t. 104, s. 717–725.

Znany jest proces upłynniania węgla brunatnego metodą termochemiczną, wymagającą dużych nakładów energii, drogiej aparatury oraz powodującą uwalnianie dużych ilości dwutlenku węgla.

Znane są również sposoby upłynniania węgla brunatnego pod wpływem procesów biologicznych noszące nazwę biosolubilizacji lub biouplynniania, polegające na hodowli grzybów i bakterii w pożywce zawierającej ten węgiel. Procesy biosolubilizacji nie wymagają dużego nakładu energii, zachodzą w niskiej temperaturze pod ciśnieniem atmosferycznym. Na efektywność tego procesu mają wpływ substancje produkowane przez mikroorganizmy takie jak: enzymy, związki alkaliczne, biosurfaktanty i chelatory.

Procesy biosolubilizacji węgla brunatnego prowadzonej przy użyciu mikroorganizmów, takich jak drożdże z rodziny *Candida* sp., bakterie *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Arthrobacter* sp. i *Pseudomonas* sp., grzyby z rodzin: *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. i *Phanerochaete chrysosporium* są opisane w czasopismach: *Critical Reviews in Biotechnology* 1991, t. 11, s. 347–366, *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, t. 52, s. 2–15 i 25–40, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, t. 42, s. 52–55, *Fuel* 2012, t. 103, s. 639–645 i *Biodegradation* 2013, t. 24, s. 305–318.

Kopalniany węgiel brunatny bez obróbki wstępnej w bardzo niewielkim stopniu ulega biosolubilizacji przez mikroorganizmy, dlatego też przed procesem biosolubilizacji musi być poddany wstępnej obróbce.

Znany jest proces chemicznej obróbki wstępnej węgla brunatnego przed procesem biosolubilizacji, przy użyciu utleniaczy, takich jak kwas azotowy (V), nadtlenek wodoru, nadmanganian (VII) potasu, opisany w czasopiśmie: *Journal of coal science & engineering* 2012, t. 18, s. 396–399.

W czasopismach: *Fuel Processing Technology* 1997, t. 52, s. 55–64, *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, s. 57–59, *Fuel Processing Technology* 2002, t. 78, s. 17–23, *Energy & Fuels* 2003, t. 17, s. 1068–1074, *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, t. 42, s. 52–55, *Mining Science and Technology* 2009, t. 19, s. 358–362, *Energy* 2009, t. 34, s. 775–781, *Fuel* 2013, t. 103, s. 639–645, *Chemical Science Transactions* 2014, t. 3, s. 1200–1206 oraz *Fuel Processing Technology* 2015, t. 131, s. 430–436 ujawniono procesy biouplynniania węgla brunatnego z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych i grzybowych, takich jak *Alternaria* sp. F5, *Phoma* sp. R2/43, *Penicillium griseopurpureum* R2/42, *Pseudomonas putida*, *Polyporus versicolor*, *Poria monticola*, *Trichoderma atroviride*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp. P6, *Trichoderma* sp. AH, *Bacillus* sp. Y7, *Aspergillus niger* i *Gordonia alkanivorans* S7, poprzedzone obróbką wstępną węgla za pomocą 8 M kwasu azotowego (V) w drastycznych warunkach.

Zgodnie z opisem patentowym PL 216479 surowe kwasy huminowe otrzymuje się metodami chemicznymi, polegającymi na traktowaniu węgla roztworem NaOH o stężeniu od 0,2–2,2%, i/lub KOH od 0,3–3,1% i/lub NH₄OH o stężeniu od 0,2–3,5% z udziałem substancji kompleksujących, takich jak pirofosforan sodu i/lub trójpolifosforan sodu i/lub heksametafosforan sodu, następnie oddzieleniu osadu od ekstraktu, i wytrąceniu kwasów huminowych poprzez zakwaszenie środowiska kwasem siarkowym.

Z opisu patentowego PL 206565, dotyczącego sposobu otrzymywania biopreparatu do degradacji węglowodorów cięższych frakcji ropy naftowej, znany jest sposób hodowli, wyizolowanych metodą racjonalnego skryningu ze środowisk skażonych węglowodorami ropy naftowej, szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 wraz z innymi szczepami bakterii, w warunkach tlenowych, w sterylnej pożywce zawierającej łatwo przyswajalne źródło węgla, azotu, fosforu, substancje wzrostowe oraz niewielki dodatek węglowodorów ropy naftowej, przy zastosowaniu jako inokulum zawiesiny kultur tych szczepów zawierającej dodatek węglowodorów cięższych frakcji ropy naftowej. Namnażanie prowadzi się na wytrząsarce mimośrodowej, przy pH 6,5, w temperaturze 30°C, w czasie 72 godzin. Jako przyswajalne źródło węgla stosuje się glukozę lub sacharozę, jako przyswajalne źródło azotu – azotan lub siarczan amonu, jako przyswajalne źródło fosforu stosuje się wodorofosforan sodu, przy czym pożywka korzystnie zawiera dodatek ekstraktu drożdżowego, makroelementy w postaci jonów potasu i magnezu oraz mikroelementy w postaci jonów manganu, żelaza i wapnia.

W opisie patentowym PL 206566, dotyczącym sposobu otrzymywania biopreparatu do degradacji węglowodorów oleju napędowego, ujawniono sposób hodowli, wyizolowanych ze środowisk skażonych węglowodorami ropy naftowej, szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 wraz z innymi szczepami bakterii, w sterylnej pożywce zawierającej łatwo przyswajalne źródło węgla, azotu, fosforu, substancje wzrostowe oraz dodatek węglowodorów oleju napędowego, przy zastosowaniu jako inokulum zawiesiny kultur tych szczepów zawierającego węglowodory oleju napędowego. Namnażanie prowadzi się na wytrząsarce mimośrodowej, przy pH 6,5 w temperaturze 28°C, w czasie 72 godzin. Stosuje się przyswajalne źródła węgla, azotu, fosforu jak w opisie patentowym PL 206565. Pożywka także korzystnie zawiera ekstrakt drożdżowy, ewentualnie zawiera makroelementy w postaci jonów potasu i magnezu oraz mikroelementy w postaci jonów manganu, żelaza i wapnia.

Sposób biosolubilizacji węgla brunatnego przy użyciu mikroorganizmu, polegający najpierw na obróbce wstępnej węgla za pomocą czynnika utleniającego, a następnie prowadzeniu hodowli produkcyjnej szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 w sterylnej pożywce zawierającej jako przyswajalne źródło węgla węgiel po obróbce wstępnej, a nadto źródło azotu organicznego, substancji wzrostowych i jonów nieorganicznych oraz wodę wodociągową, zaszczerpionej inokulum tych bakterii, według wynalazku, polega na tym, że węgiel brunatny o granulacji 0,8–2 mm poddaje się obróbce wstępnej za pomocą nadtlenu wodoru o stężeniu 10–20% wagowych poddanego uprzednio ozonowaniu, stosując 2 części objętościowe ozonowanego nadtlenu na 1 część masową węgla, wkraplanego do węgla w czasie 1 godziny, po czym węgiel inkubuje się w temperaturze 20–30°C w czasie 3–7 dni, statycznie lub w trakcie mieszania i oddziela się przygotowany w ten sposób węgiel od fazy ciekłej. Następnie prowadzi się hodowlę produkcyjną wstrząsaną szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 w sterylnej pożywce hodowlanej zawierającej w 1 l wody wodociągowej w częściach wagowych: 5 części węgla po obróbce wstępnej, 50 części organicznego źródła azotu, 25 części substancji wzrostowych, 25 części jonów nieorganicznych, zaszczerpionej inokulum tych bakterii zawierającym 10^8 – 10^7 komórek bakterii/ml, użytym w ilości 7,5–10 ml/l podłoża, w warunkach tlenowych w temperaturze 25–30°C w czasie 7–10 dni. Inokulum szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 otrzymuje się z selektanta tego szczepu, wyizolowanego z gleby zanieczyszczonej ropą naftową i przechowywanego na podłożu agarowym zawierającym w 1 l wody wodociągowej w częściach wagowych: 50 części źródła azotu organicznego, 25 części substancji wzrostowych, 25 części jonów nieorganicznych, w drodze hodowli wstrząsanej tego selektanta w pożywce zawierającej w 1 l wody wodociągowej w częściach wagowych: 1–5 części węgla po obróbce wstępnej w postaci miazgi, 50 części źródła azotu organicznego, 25 części substancji wzrostowych, 25 części jonów nieorganicznych, w temperaturze 25–30°C w czasie 2–3 dni. Ozonowanie nadtlenu wodoru użytego do obróbki wstępnej węgla prowadzi się za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza, zawierającej 80–100 g ozonu/m³ mieszaniny, stosując 6–9 l tej mieszaniny na 100–150 ml nadtlenu wodoru, wprowadzanej z szybkością 0,1 l/minutę, w temperaturze 19–20° w czasie 60–90 minut. W pożywkach hodowlanych stosuje się jako źródło azotu organicznego korzystnie baktiopepton, jako substancje wzrostowe korzystnie ekstrakt drożdżowy, a nadto jako źródło jonów nieorganicznych chlorek sodu.

Sposób według wynalazku umożliwia uzyskanie heterogennej płynnego produktu zawierającego w fazie ciekłej 9–13 mg/ml kwasów huminowych oraz fazę stałą przy ubytku suchej masy węgla na poziomie 54–64%.

Sposób według wynalazku ilustrują bliżej niżej podane przykłady. Do obróbki wstępnej węgla wykorzystano aparaturę zawierającą wytwornicę ozonu BMT 803N, firmy BMT Messtechnik, szklany reaktor, osuszacz DH3 firmy BMT Messtechnik oraz miernik stężenia ozonu BMT 964 także firmy BMT Messtechnik.

Przykład I

100 ml nadtlenu wodoru o stężeniu 10%, po ozonowaniu w reaktorze szklanym mieszaniną ozonu i powietrza zawierającą ozon w ilości 100 g/m³, przepływającą z szybkością 0,1 l/min, wkroplono w czasie 1 godziny do 50 g węgla brunatnego o ziarnistości 0,8–2 mm. Następnie węgiel inkubowano w temperaturze 20°C statycznie 7 dni i sączono na sączku bibułowym, węgiel pozostały na sączku suszono w temperaturze 50°C i stosowano w procesie biosolubilizacji.

Selektant szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7, wyizolowany z gleby zanieczyszczonej ropą naftową i przechowywany na podłożu agarowym o nazwie LB agar, zawierającym 50 części wagowych baktepeptonu, 25 części wagowych ekstraktu drożdżowego i 25 części chlorku sodu na 1000 części wody destylowanej, zalano 5 ml soli fizjologicznej i wymieszano, aby komórki bakterii były zawieszone w całej objętości roztworu. Tak uzyskaną zawiesinę komórek bakterii wprowadzono do kolby o pojemności 1 l zawierającej 100 ml podłoża o składzie w procentach wagowych w przeliczeniu na objętość podłoża: 1% peptonu, 0,5% ekstraktu drożdżowego, 0,5% chlorku sodu oraz 0,1% węgla po obróbce wstępnej w postaci miazgi o średnicy ziaren <0,6 mm i prowadzono hodowlę wstrząsaną w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C w czasie 3 dni na wytrząsarce mimośrodowej o amplitudzie 4,5 cm, przy szybkości obrotów 200 min⁻¹, w celu uzyskania inokulum właściwego. 100 ml uzyskanego inokulum właściwego bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 zawierającego 10⁸ – 10⁷ komórek/ml dodano do kolby o pojemności 1 l, zawierającej 5 g s.m. węgla obrobionego wstępnie i wysterylizowanego w temperaturze 121°C przez 15 minut oraz wysterylizowane 50 części wagowych baktepeptonu, 25 części wagowych ekstraktu drożdżowego i 25 części chlorku sodu i prowadzono biosolubilizację węgla w drodze hodowli produkcyjnej szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C na wytrząsarce mimośrodowej o amplitudzie 4,5 cm przy szybkości obrotów 200 min⁻¹ w czasie 7 dni. Uzyskaną po tym czasie mieszaninę sączono na sączku bibułowym otrzymując 70 ml ciekłego biosolubilizowanego węgla o stężeniu kwasów huminowych 9,6 mg/ml. Ubytek suchej masy węgla w wyniku biosolubilizacji był równy 64%.

Przykład II

100 ml nadtlenu wodoru o stężeniu 15%, po ozonowaniu w reaktorze szklanym mieszaniną ozonu i powietrza zawierającą ozon w ilości 100 g/m³ przepływającą z szybkością 0,1 l/min, wkroplono w czasie 1 godziny do 50 g węgla brunatnego o ziarnistości 0,8–2 mm. Następnie węgiel inkubowano w temperaturze 20°C statycznie 7 dni i sączono na sączku bibułowym, węgiel pozostały na sączku suszono w temperaturze 50°C i stosowano w procesie biosolubilizacji.

Selektant szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 wyizolowany jak w przykładzie I przechowywany na podłożu agarowym LB agar o składzie jak w przykładzie I, zalano 5 ml soli fizjologicznej i wymieszano, aby komórki bakterii były zawieszone w całej objętości roztworu. Tak uzyskaną zawiesinę komórek bakterii wprowadzono do kolby o pojemności 1 l zawierającej 100 ml podłoża o składzie w procentach wagowych w przeliczeniu na objętość podłoża: 1% peptonu, 0,5% ekstraktu drożdżowego, 0,5% chlorku sodu oraz 0,1% węgla po obróbce wstępnej w postaci miazgi o średnicy ziaren <0,6 mm i prowadzono hodowlę wstrząsaną inokulum w warunkach jak w przykładzie I. 100 ml uzyskanego inokulum właściwego bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 zawierającego 10⁸ – 10⁷ komórek/ml dodano do kolby o pojemności 1 l, zawierającej 5 g s.m. węgla obrobionego wstępnie i wysterylizowanego w temperaturze 121°C przez 15 minut oraz wysterylizowane 50 części wagowych baktepeptonu, 25 części wagowych ekstraktu drożdżowego i 25 części chlorku sodu i prowadzono biosolubilizację węgla w drodze hodowli produkcyjnej szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 w warunkach jak w przykładzie I. Uzyskaną po tym czasie mieszaninę sączono na sączku bibułowym otrzymując 70 ml ciekłego biosolubilizowanego węgla o stężeniu kwasów huminowych 12,6 mg/ml. Ubytek suchej masy węgla w wyniku biosolubilizacji był równy 54%.

Przykład III

100 ml nadtlenu wodoru o stężeniu 20%, po ozonowaniu w reaktorze szklanym mieszaniną ozonu i powietrza zawierającą ozon w ilości 100 g/m³, przepływającą z szybkością 0,1 l/min, wkroplono w czasie 1 godziny do 50 g węgla brunatnego o ziarnistości 0,8–2 mm. Następnie węgiel inkubowano w temperaturze 20°C statycznie 7 dni i sączono na sączku bibułowym, węgiel pozostały na sączku suszono w temperaturze 50°C i stosowano w procesie biosolubilizacji.

Selektant szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 wyizolowany jak w przykładzie I i przechowywany na podłożu agarowym LB agar o składzie jak w przykładzie I, zalano 5 ml soli fizjologicznej i wymieszano, aby komórki bakterii były zawieszone w całej objętości roztworu. Tak uzyskaną zawiesinę komórek bakterii wprowadzono do kolby o pojemności 1 l zawierającej 100 ml podłoża o składzie w procentach wagowych w przeliczeniu na objętość podłoża: 1% peptonu, 0,5% ekstraktu drożdżowego, 0,5% chlorku sodu oraz 0,1% węgla po obróbce wstępnej w postaci mąki o średnicy ziaren <0,6 mm i prowadzono hodowlę wstrząsaną inokulum w warunkach jak w przykładzie I. 100 ml uzyskanego inokulum właściwego bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 zawierającego $10^8 - 10^7$ komórek/ml dodano do kolby o pojemności 1 l, zawierającej 5 g s.m. węgla obrobionego wstępnie i wysterylizowanego w temperaturze 121°C przez 15 minut oraz wysterylizowane 50 części wagowych bakteopeptonu, 25 części wagowych ekstraktu drożdżowego i 25 części chlorku sodu i prowadzono biosolubilizację węgla w drodze hodowli produkcyjnej szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 w warunkach jak w przykładzie I. Uzyskaną po tym czasie mieszaninę sączo na sączku bibułowym otrzymując 70 ml ciekłego biosolubilizowanego węgla o stężeniu kwasów huminowych 10,4 mg/ml. Ubytek suchej masy węgla w wyniku biosolubilizacji był równy 56%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób biosolubilizacji węgla brunatnego przy użyciu mikroorganizmu, polegający najpierw na obróbce wstępnej węgla za pomocą czynnika utleniającego, a następnie prowadzeniu hodowli produkcyjnej szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 w sterylnej pożywce zawierającej jako przyswajalne źródło węgla węgiel po obróbce wstępnej, a nadto źródło azotu organicznego, substancji wzrostowych i jonów nieorganicznych oraz wodę wodociągową, zaszczerpionej inokulum tych bakterii, **znamienny tym**, że węgiel brunatny o granulacji 0,8–2 mm poddaje się obróbce wstępnej w drodze działania na niego nadtlutkiem wodoru o stężeniu 10–20% wagowych, poddanym uprzednio ozonowaniu, stosując 2 części objętościowe ozonowanego nadtlutku na 1 część masową węgla, wkraplanego do węgla w czasie 1 godziny, po czym węgiel inkubuje się w temperaturze 20–30°C w czasie 3–7 dni, statycznie lub w trakcie mieszania i oddziela się przygotowany w ten sposób węgiel od fazy ciekłej, następnie prowadzi się hodowlę produkcyjną wstrząsaną szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 w sterylnej pożywce hodowlanej zawierającej w 1 l wody wodociągowej w częściach wagowych: 5 części węgla po obróbce wstępnej, 50 części organicznego źródła azotu, 25 części substancji wzrostowych, 25 części jonów nieorganicznych, zaszczerpionej inokulum tych bakterii zawierającym $10^8 - 10^7$ komórek bakterii/ml, użytym w ilości 7,5–10 ml/l podłoża, w warunkach tlenowych w temperaturze 25–30°C w czasie 7–10 dni.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ozonowanie nadtlutku wodoru użytego do obróbki wstępnej węgla prowadzi się za pomocą mieszaniny ozonu i powietrza, zawierającej 80–100 g ozonu/m³ mieszaniny, stosując 6–9 l tej mieszaniny na 100–150 ml nadtlutku wodoru, wprowadzanej z szybkością 0,1 l/minutę, w temperaturze 19–20° w czasie 60–90 minut.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że inokulum szczepu bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 otrzymuje się z selektanta tego szczepu wyizolowanego z gleby zanieczyszczonej ropą naftową i przechowywanego na podłożu agarowym zawierającym w 1 l wody wodociągowej w częściach wagowych: 50 części źródła azotu organicznego, 25 części substancji wzrostowych, 25 części jonów nieorganicznych, w drodze hodowli wstrząsanej tego selektanta w pożywce zawierającej w 1 l wody wodociągowej w częściach wagowych: 1–5 części węgla po obróbce wstępnej w postaci mąki, 50 części źródła azotu organicznego, 25 części substancji wzrostowych, 25 części jonów nieorganicznych, w temperaturze 25–30°C w czasie 2–3 dni.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w pożywkach hodowlanych stosuje się jako źródło azotu organicznego bakteopepton, jako substancje wzrostowe ekstrakt drożdżowy, a nadto jako źródło jonów nieorganicznych chlorek sodu.