



(51) МПК
C02F 3/34 (2006.01)
C12N 1/26 (2006.01)
C02F 101/32 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/38 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015137602/10, 03.09.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 20.08.2013

Приоритет(ы):

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
 из которой данная заявка выделена: 2013138582
 20.08.2013

(45) Опубликовано: 10.12.2016 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: RU 2426698 C2, 20.08.2011. RU 2138451
 C1, 27.09.1999. RU 2378060 C2, 10.01.2010.

Адрес для переписки:

101000, Москва, Сретенский б-р, 11, Публичное
 акционерное общество "Нефтяная компания
 "ЛУКОЙЛ"

(72) Автор(ы):

Маркарова Мария Юрьевна (RU),
 Щемелинина Татьяна Николаевна (RU),
 Заикин Игорь Алексеевич (RU),
 Чиковани Марина Анатольевна (RU),
 Кравченко Валерий Валентинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Публичное акционерное общество "Нефтяная
 компания "ЛУКОЙЛ" (RU)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ ПРЭСНОВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКИХ ШИРОТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ очистки от нефти и нефтепродуктов пресноводных объектов и экосистем. Осуществляют контактирование подлежащих разложению углеводородов нефти с биопрепаратом, состоящим из смеси нефтеокисляющих штаммов культур *Microbacterium species* ВКМ Ас-2614D, *Pseudomonas migulae* ВКМ В-2761D, *Rhodococcus erythropolis*

ВКМ Ас-2612D, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2611D, взятых в соотношении 1:1:1:1. Титр клеток в готовом препарате составляет не менее 10^{10} клеток на 1 г. Способ обеспечивает достижение высокой скорости биодеструкции нефти в водных средах в температурном диапазоне от 0 до +25°C, в том числе в ледовых условиях. 4 з.п. ф-лы, 4 ил., 7 табл., 6 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 604 788** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C02F 3/34 (2006.01)
C12N 1/26 (2006.01)
C02F 101/32 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/38 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2015137602/10, 03.09.2015**

(24) Effective date for property rights:
20.08.2013

Priority:

(62) Number and date of filing of the initial application,
from which the given application is allocated:
2013138582 20.08.2013

(45) Date of publication: **10.12.2016** Bull. № 34

Mail address:

**101000, Moskva, Sretenskij b-r, 11, Publichnoe
aktsionernoe obshchestvo "Neftjanaja kompanija
"LUKOIL"**

(72) Inventor(s):

**Markarova Marija JUrevna (RU),
SHChemelinina Tatjana Nikolaevna (RU),
Zaikin Igor Alekseevich (RU),
CHikovani Marina Anatolevna (RU),
Kravchenko Valerij Valentinovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Publichnoe aktsionernoe obshchestvo
"Neftjanaja kompanija "LUKOIL" (RU)**

(54) **METHOD OF CLEANING FRESHWATER ECOSYSTEMS FROM OIL AND OIL PRODUCTS AT HIGH LATITUDES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology.
Method of cleaning freshwater ecosystems from oil and oil products is proposed. Method comprises contacting oil hydrocarbons to be decomposed with a biopreparation, consisting of a mixture of oil-oxidising Microbacterium species VKM Ac-2614D, Pseudomonas migulae BKM B-2761D, Rhodococcus erythropolis

VKM Ac-2612D, Rhodococcus erythropolis VKM Ac-2611D strains, taken in ratio of 1:1: 1:1. Cell titre in the ready preparation is, at least, 10^{10} cells per 1 g.

EFFECT: method provides high rate of biodegradation of oil in aqueous media in temperature range from 0 to +25 °C, including ice conditions.

5 cl, 4 dwg, 7 tbl, 6 ex

RU 2 604 788 C1

RU 2 604 788 C1

Изобретение относится к биотехнологии, методам очистки нефтезагрязненных водных экосистем и может быть использовано для ликвидации последствий нефтяных разливов, очистки от нефтяных загрязнений пресноводных объектов в широком диапазоне температур (от 0 до +25°C), в том числе в ледовых условиях, а именно очистки поверхности льда, ледяной шуги, воды от плавающей нефти, толщи воды от растворенных углеводов, донных отложений и береговой зоны водных объектов от осажженной нефти.

Известен гидрофобный органоминеральный нефтяной биосорбент на сорбенте "СОРБОНАФТ" (патент РФ №2318736). 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. Недостатком изобретения является необходимость уборки сорбированной массы после завершения сорбции нефти, а также снижение эффективной биодеструкции нефти в толще сорбента при температуре ниже +15°C.

Известен комплексный биосорбент для очистки водоемов от нефти и нефтепродуктов, включающий в качестве носителя гидрофобный нефтяной сорбент на основе торфа и нефтеокисляющие микроорганизмы, иммобилизованные на носителе в эффективном количестве (патент РФ №2422587). Иммобилизование на носителе микроорганизмов осуществляют адсорбционным способом с получением индивидуальных сорбентов: бактериального с культурой *Rhodococcus equi* P-72-00, дрожжевого с культурой *Rhodotorula glutinis* 2-4 М и грибного с мицелиальным грибом *Trichoderma lignorum* F-98, при этом комплексный биосорбент для очистки содержит композицию индивидуальных сорбентов, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

бактериальный с культурой <i>Rhodococcus equi</i> P-72-00	45-55;	
дрожжевой с культурой <i>Rhodotorula glutinis</i> 2-4 М	45-55, или бактериальный с культурой <i>Rhodococcus equi</i> P-72-00	45-55;
грибной с мицелиальным грибом <i>Trichoderma lignorum</i> F-98	45-55, или бактериальный с культурой <i>Rhodococcus equi</i> P-72-00	40-50;
дрожжевой с культурой <i>Rhodotorula glutinis</i> 2-4 М	20-35;	
грибной с мицелиальным грибом <i>Trichoderma lignorum</i> F-98	25-35.	

Биосорбент применяют совместно с концентрированной культурой микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer при соотношении компонентов по сухому веществу, мас. %: биосорбент 90-97, биомасса микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer 3-10. Преимуществом предложенного биосорбента является то, что он эффективно осуществляет одновременно сорбцию и разложение нефти в водной толще и в массе сорбента, а именно при загрязнении нефтью водного субстрата до 15 г/л и более 50% массы сорбента при исходном весовом соотношении 1:1 нефти и биосорбента, а также деструкцию токсичных нефтепродуктов ДТ при концентрации около 40% или 7 г/л, бензиновых и керосиновых фракций в массе загрязненной воды шламонакопителя при исходном весовом соотношении нефтепродуктов и биосорбента 1:2. Эффективность очистки субстратов от нефти достигается за счет применения иммобилизованных на гидрофобном сорбенте штаммов бактериального, дрожжевого и грибного консорциума в присутствии зеленых микроводорослей рода *Chlorella* и состоит в снижении содержания нефтепродуктов в сорбенте за 60 суток на 70-89%. Недостатком способа является необходимость уборки отработанного сорбента с водной поверхности после сорбции нефти, слабая эффективность при низкой (менее 15-20°C) температуре среды, а также трудоемкость и неудобство применения, поскольку необходимо готовить конкретные

виды сорбентов в зависимости от условий применения.

Наиболее близким, по существу, к предлагаемому является способ биовосстановления для ускоренного биологического разложения углеводородов нефти в полярных регионах, покрытых морским льдом, и смесь бактерий и ферментов в качестве средства для осуществления способа (Патент RU №2426698). Способ биологического разложения углеводородов нефти в полярных регионах, покрытых морским льдом, включает контактирование подлежащих разложению углеводородов нефти с инокулятом. Причем инокулят содержит смесь адаптированных к холоду бактерий, состоящую из по меньшей мере следующих штаммов: Rhodococcus GH-1 (DSM 18943, DSMZ 22.12.2006), Dietzia GH-2 (DSM 18944, DSMZ 22.12.2006), Shewanella GH-4 (DSM 18946, DSMZ 22.12.2006), Marinobacter GH-9 (DSM 18951, DSMZ 22.12.2006), Pseudomonas GH-10 (DSM 18952, DSMZ 22.12.2006), Oleispira GH-11 (DSM 18953, DSMZ 22.12.2006), а также питательных веществ и по меньшей мере одного благоприятного для окружающей среды носителя, на котором иммобилизованы по меньшей мере указанные, предназначенные для использования, штаммы бактерий. Изобретение позволяет повысить эффективность разложения углеводородов нефти в полярных регионах, покрытых морским льдом. В предложенном способе биовосстановления используют смесь из нескольких адаптированных к холоду аутохтонных штаммов бактерий. При этом использованные адаптированные к холоду штаммы бактерий варьируют по их областям температуры и солености, чтобы способ биовосстановления был эффективен при всех температурах, наступающих в природных условиях. Но все штаммы бактерий в смеси объединяет то, что они также еще проявляют активность (разложение или образование эмульгаторов) при -3°C . Контактное взаимодействие подлежащих разложению углеводородов нефти осуществляют с инокулятом, находящимся в жидком виде, путем заливания или разбрызгивания на морской лед и/или внесения или накачивания в столб воды под морским льдом. Могут быть использованы носители для микроорганизмов в виде: неорганических питательных веществ, окруженных оболочкой жирной кислоты, шариков из арамидного полимера и активированного угля с мембранной оболочкой, белков, образующих волокна, рыбной муки, окруженной полисорбатом 80, или опилок. Недостатком способа является высокая степень рассеивания активной биомассы в среде, а также ограничение пространства активной деструкции нефтяного загрязнения непосредственной зоной аккумуляции аутохтонных нефтеокисляющих бактерий на носителе, также медленная утилизируемость в водной среде носителя.

Задачей изобретения является разработка способа эффективной очистки от нефти и нефтепродуктов поверхности воды, льда, ледяной шуги, толщи воды, донных отложений и береговой зоны пресноводных экосистем в диапазоне температур от 0 до $+25^{\circ}\text{C}$ для применения в промышленных масштабах с учетом особенностей загрязненных объектов.

Технический результат состоит в оптимизации очистки от нефти водных объектов, в том числе в условиях низких и нормальных температур за счет использования комплекса природных психрофильных нефтеокисляющих микроорганизмов, продуцирующих биосурфактанты, снижающие вязкость нефти и способствующие усилению сорбции нефти в частично гидрофобный торфяной сорбент, используемый как носитель для нефтеокисляющих микроорганизмов и их продуцентов (биосурфактантов), в котором задан периодом плавучести, и разрушающийся после завершения процесса деструкции нефти до безопасных для живых организмов простых веществ, вследствие чего после обработки загрязненных нефтью объектов не остается необходимости проводить уборку и последующую утилизацию сорбента и нефти.

Преимущество применения природных психрофильных нефтеокисляющих микроорганизмов, продуцирующих биосурфактанты, как отдельно, так и на природном сорбенте для очистки нефтезагрязненных водных экосистем состоит в том, что происходит ускоренная деструкция нефти в широком натуральном (естественном) температурном диапазоне. При применении носителя (сорбента) наличие продуцированных микорорганизмами биосурфактантов в составе биосорбентов обеспечивает ускоренную сорбцию нефти в толщу сорбента в тот период, когда сорбент еще «на плаву». В зависимости от условий применения (поверхность воды, льда, толщина воды, донные отложения, загрязненные участки суши и береговой зоны пресноводных экосистем) на стадии изготовления биосорбента подбирают соответствующий консорциум для инокуляции сорбента.

Для очистки пресноводных экосистем используется биопрепарат Soilin-P, в состав которого входит консорциум психрофильных штаммов следующих нефтеокисляющих микроорганизмов:

- *Microbacterium species* КР-216О_1 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов, номер VKM Ac-2614D), работающий в температурном диапазоне от +2 до +25°C, активизирует снижение в воде растворенных нефтепродуктов и очистку донных отложений от нефтяных углеводородов при низкой концентрации в воде кислорода и при температуре среды от +2 до 25°C. Синтезирует природные биосурфактанты группы гликолипидов тригазолипиды в ответ на присутствие n-алканов в среде, способствующие снижению вязкости нефти;

- *Pseudomonas migulae* КР-24СО (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов, номер VKM B-2761D), обладает высокой нефтеокисляющей активностью в отношении нафтеновых углеводородов, способен эффективно снижать концентрацию растворенных в воде углеводородов и ускоряет разрушение нефти в почвах и донных отложениях водоемов при температуре от +1 до +20 градусов Цельсия. Синтезирует природный биосурфактант группы липопептидов вискозин в ответ на присутствие в среде нефти, способствуя тем самым снижению ее вязкости;

- *Rhodococcus erythropolis* КР-718СО.2 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов, номер VKM Ac-2612D) эффективен в температурном диапазоне от +4 до +25°C для разрушения нафтеновых и полиароматических углеводородов, снижает концентрацию бензо(а)пирена в среде, в связи с чем перспективен для очистки береговой зоны водных объектов, нефтезагрязненных участков, подвергавшихся выжиганию, воды пресноводных объектов и обладает выраженной способностью к образованию биосурфактантов - синтезирует природные биосурфактанты группы гликолипидов тригазолипиды в ответ на присутствие n-алканов в среде, способствующие снижению вязкости нефти;

- *Rhodococcus erythropolis* КР-216О_2 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов, номер VKM Ac-2611D) проявляет нефтеокисляющую активность в отношении нафтеновой, ароматической и полиароматических фракций нефти в температурном диапазоне от 0 до +25°C и может быть использован для очистки и водных и наземных экосистем от нефти и нефтепродуктов. Синтезирует природные биосурфактанты группы гликолипидов тригазолипиды в ответ на присутствие n-алканов в среде, способствующие снижению вязкости нефти.

В составе комплексного биопрепарата Soilin-P соотношение штаммов равное по

высушенной биомассе 1:1:1:1. Титр клеток в готовом препарате не менее 10^{10} клеток на 1 г.

В зависимости от условий применения биопрепараты применяют отдельно или на носителе в виде биосорбента, содержащего частично гидрофобный носитель с заданным периодом плавучести с иммобилизованными в нем штаммами. Отдельно использование биопрепаратов оптимально для очистки от нефти и растворенных углеводов небольших закрытых водоемов, а на сорбенте для удаления нефтяного загрязнения с поверхности льда, почвы береговой зоны, очистки ледяной шуги, для удаления плавающей нефти с поверхности водных объектов, очистки толщи воды от растворенных углеводов и обеспечения разрушения углеводов в массе донных отложений.

В качестве носителя используют торфяной сорбент с заданным периодом плавучести от одного до 48 ч. Используется готовый торфяной сорбент, технология приготовления которого основана на безреагентной гидрофобизации верхового торфа путем селективного удаления гидрофильных групп органических молекул и надмолекулярных ассоциатов, происходящего в результате пиролиза (ООО "Техносорб", г. Кирово-Чепецк). Вследствие заданной температуры и времени пиролиза сорбент приобретает частичную гидрофобность и способность удерживаться на поверхности водного объекта необходимое для эффективной очистки от плавающей на поверхности водоема нефти время (заданный период плавучести от 1 часа до 2 суток). Использование именно торфяного сорбента было обусловлено его способностью разрушаться в природной среде до компонентов, безопасных для природной среды и включающихся в дальнейший нормальный круговорот веществ экосистемы.

Биосорбент контактируют со средой загрязнения. На поверхности, загрязненные нефтью (лед, почву, воду), биосорбент распыляют одним из двух известных способов - в сухом виде из ранцевого распылителя или в направленной струе воды из мотопомпы. После контакта нефти с биосорбентом, содержащим психрофильные нефтеоокисляющие микроорганизмы и биосурфактанты, сразу начинается процесс сорбции нефти, в толще сорбента происходит процесс биодеструкции, который продолжается до полного разрушения углеводов в толще сорбента на дне водоема. Сорбированная нефть теряет способность налипать на твердые предметы, что актуально для снижения риска попадания нефтяного загрязнения на кожные покровы водных обитателей и птиц как на поверхности воды, так и на береговой территории загрязненных объектов. После распыления биосорбента в водную среду часть микроорганизмов выходит в водную фазу и способствует снижению массовой доли растворенных в воде углеводов, а после опускания биосорбента на дно водоема продолжается процесс их размножения, приводящий к окислению нефти в массе донных отложений, что дает возможность использовать его для очистки донных отложений от ранее попавшей в них нефти. По окончании процесса деструкции нефти масса нефтеоокисляющих микроорганизмов снижается до фоновых величин, а сам сорбент разрушается до простых соединений.

Таким образом, задача очистки закрытых небольших водоемов от нефти и нефтезагрязнений решается использованием биопрепаратов и биопрепаратов на носителе, частично гидрофобном биосорбенте с заданным периодом плавучести, где для улучшения эффективности очистки водных сред от плавающей нефти в зависимости от температуры среды используется фактор времени сорбции и плавучести биосорбентов, а усилению сорбции нефти в толщу биосорбента способствуют снижающие вязкость нефти природные биосурфактанты, выделяемые микроорганизмами в составе биопрепаратов, которые, в свою очередь, обеспечивают биодеструкцию нефти в

диапазоне температур от 0 до +25°C как в толще сорбента, так и вне его. После сорбции нефти биосорбент не нуждается в уборке, осаждается на дно водоема, где происходит завершение процесса биоразрушения углеводов и разрушается до соединений, безопасных для природной среды, сам сорбент.

5 Примеры осуществления способа.

Пример 1. Изготовление биопрепаратов и биосорбентов.

На стадии изготовления биосорбентов отдельно методом глубины ферментации готовят биопрепараты с использованием жидких питательных сред.

Для штаммов препарата Soilin-P используют питательную среду на 1000 мл воды -
10 берут, г, NaNO_3 - 3,0; KH_2PO_4 - 1,0; KCl - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; FeSO_4 - 0,01; NaCl - 1,5; пептон ферментативный - 20,0; дрожжевой экстракт (дрожжевой автолизат) - 1,0; алканы (или дизельное топливо) - 10,0. Каждый штамм нарабатывают по отдельности, и в зависимости от требуемого объема могут быть одна, две или три стадии наработки биомассы. Первая стадия - наработка биомассы штамма из пробирки путем высева
15 микробиологической петли в колбы со стерильной средой, культивирование на шейкере при 15-25°C, 180-220 об/мин, 3-5 суток. Вторая - инокулятом из колб заражают миниферментеры (объем 100 л) с готовой стерильной питательной средой - 3 суток. Третья - из миниферментеров заражают промышленные ферментеры объемом до 60
20 м³ с готовой стерильной питательной средой - 3 суток. Для приготовления препаратов без носителя после изготовления жидкой формы производят высушивание отдельно выращенных штаммов в режиме распылительной сушки при температуре не более +70°C, готовую массу осаждают на диаммонифосфате и фасуют в полиэтиленовые пакеты по 1-10 кг. Титр клеток в сухих препаратах составляет 1-5 млрд/кл на 1 г.
25 Влажность готового высушенного препарата не должна превышать 20%. В таком виде препараты при условии отсутствия прямого солнечного света могут храниться при температуре +4 - +30°C с сохранением своих свойств не менее 3-х лет. Перед использованием биопрепаратов по назначению в зависимости от условий их применения производят смешивание в равных количествах сухой биомассы отдельных штаммов и
30 растворяют необходимое для объема очищаемого объекта количество готовых препаратов в воде из расчета 1 кг сухой биомассы на 100 л воды. В виде раствора препараты вносят в загрязненный водоем из расчета 1 кг сухой биомассы для очистки от растворенных углеводов 100 м³ воды.

При изготовлении биосорбента для заданных условий биомассой микроорганизмов
35 по окончании любой из требуемых по объему продукта стадий ферментации заражают нанесением в виде распыления заранее приготовленный сорбент с заданным периодом плавучести из расчета 10 л биомассы с титром клеток 10 млрд/мл на 1 м³ сорбента и высушивают в токе теплого (не выше +40°C) воздуха до воздушно-сухого состояния. Титр живых клеток в сухом биосорбенте составляет не менее 100 млн. клеток на 1 г.

40 Использование биосорбентов осуществляют при решении следующих задач очистки от нефти экосистем: очистка поверхности воды, и/или очистка поверхности льда, и/или очистка воды при образовании ледяной шуги, и/или очистка береговой зоны загрязненных объектов, и/или очистка донных отложений.

Пример 2. Нефтеемкость биосорбентов и влияние биопрепаратов на скорость сорбции.

45 Сорбент можно наносить на водную поверхность двумя способами: в сухом виде при незначительной (до 100 м²) площади разлива с использованием ранцевого распылителя и в струе воды с применением пожарного оборудования при значительной площади нефтяного загрязнения. При этом расход биосорбента зависит от площади и

толщины нефтяной пленки на поверхности. Нефтеемкость биосорбента составляет 400-700%, расход сорбента зависит от вязкости нефти (табл. 1).

Время образования конгломерата от 1 минуты до 10 минут, период плавучести задается в зависимости от температурных условий от 1 часа до 2 суток.

5 Время сорбции нефти в зависимости от температуры среды при использовании биосорбентов с препаратом Soilin-P для пресных вод в 5-7 раз короче, чем для сорбентов без препаратов. Вязкость нефти при попадании на нее биопрепаратов снижается при температуре +5 - +10°C от 150 до 30-50 сСт.

10 Таблица 1 - Нормы расхода нефтяного сорбента при ликвидации нефтяных загрязнений, тонн/га

Вязкость нефти или нефтепродукта, сСт	Толщина слоя загрязнения, мм			
	10	1	0.1	0.01
1	28.9	2.9	0.3	0.03
15 10	24.4	2.4	0.3	0.03
50	14.4	1.5	0.2	0.03
100	9.8	1.0	0.1	0.02
150	7.6	0.8	0.1	0.02

20 Пример 3. Оценка скорости очистки водных сред при отличающейся температуре среды в присутствии биопрепарата Soilin-P и инокулированными ими биосорбентами.

Были проведены лабораторные испытания (табл. 2) нескольких модификаций разработанного биосорбента, отличающиеся периодом плавучести (1 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч). В качестве контрольного варианта рассматривали сорбент без микробной массы. Нулевым контролем был вариант без использования сорбентов и микроорганизмов. 25 Также испытывали скорость разложения нефти в вариантах без сорбента в индивидуальных препаратах. Опыт проведен при температурах +10, +5, 0 градусов Цельсия. Пресноводный биопрепарат Soilin-P испытан на дистиллированной воде. В составе испытанных биопрепаратов присутствовали все рекомендованные штаммы.

30 Таблица 2 - Наименование и обозначение вариантов по схеме опыта

Базовые варианты	Обозначения сорбентов по времени плавучести			
	1 час	12 часов	24 часа	48 часов
Нулевой контроль (K ₀)				
35 Сорбент без микроорганизмов -	C ₁	C ₁₂	C ₂₄	C ₄₈
контроль (С)				
40 Биосорбенты для пресных сред (БСП)	БСП ₁	БСП ₁₂	БСП ₂₄	БСП ₄₈
Soilin-P				

Таким образом, в опыте испытано 15 вариантов, каждый из них при трех видах температур (таблица 3). В опыте оценивали скорость полной сорбции нефти в вариантах с сорбентами (с), время утолнения сорбента в вариантах с сорбентами (ч), динамику 45 растворенных в воде углеводородов во всех вариантах (мг/дм³), скорость деструкции нефти в массе утолненного сорбента и в массе нефти в вариантах без сорбента (мг/кг).

Таблица 3 - Схема опыта с разными температурами воды ($^{\circ}\text{C}$)

Наименование базового варианта	Обозначение модификации	0	5	10
Нулевой контроль (K_0)	K_0	$0K_0$	$5K_0$	$10K_0$
Сорбент без микроорганизмов - контроль (C)	C_1	$0C_1$	$5C_1$	$10C_1$
	C_{12}	$0C_{12}$	$5C_{12}$	$10C_{12}$
	C_{24}	$0C_{24}$	$5C_{24}$	$10C_{24}$
	C_{48}	$0C_{48}$	$5C_{48}$	$10C_{48}$
Биосорбенты для пресных вод (БСП)	$БСП_1$	$0БСП_1$	$5БСП_1$	$10БСП_1$
	$БСП_{12}$	$0БСП_{12}$	$5БСП_{12}$	$10БСП_1$
	$БСП_{24}$	$0БСП_{24}$	$5БСП_{24}$	$10БСП_2$
	$БСП_{48}$	$0БСП_{48}$	$5БСП_{48}$	$10БСП_4$
Soilin-P	$КП$	$0КП$	$5КП$	$10КП$

Таблица 4 — Динамика растворенных в воде углеводородов, $\text{мг}/\text{дм}^3$

№ п/п	Вариант	В начале опыта	Через 24 часа	Через 48 часов	Через 72 часа
1	$0K_0$	1.23	1.21	1.22	1.22
2	$5K_0$	2.48	2.65	2.87	2.85
3	$10K_0$	3.26	3.35	3.48	3.53
4	$0C_1$	0.65	0.52	0.47	0.31
5	$5C_1$	1.17	0.98	0.92	0.84
6	$10C_1$	3.19	2.56	2.47	1.98
7	$0C_{12}$	1.14	1.02	0.95	0.94
8	$5C_{12}$	2.59	2.41	2.31	2.26
9	$10C_{12}$	3.45	2.98	2.65	2.91
10	$0C_{24}$	1.18	1.05	0.98	0.95
11	$5C_{24}$	2.48	2.32	2.14	2.18
12	$10C_{24}$	3.28	3.15	2.95	2.98
13	$0C_{48}$	1.20	1.14	1.09	1.04

14	5C ₄₈	2.41	2.21	2.10	2.01
15	10C ₄₈	3.49	3.21	3.01	3.10
28	0БСП ₁	4.03	3.21	2.56	1.54
29	5БСП ₁	5.12	4.41	3.18	2.16
30	10БСП ₁	5.98	3.54	2.11	1.10
31	0БСП ₁₂	2.76	2.21	1.54	1.26
32	5БСП ₁₂	4.92	3.14	2.26	1.21
33	10БСП ₁₂	5.46	3.18	2.01	1.14
34	0БСП ₂₄	3.14	2.17	1.45	1.12
35	5БСП ₂₄	4.23	3.45	2.34	1.65
36	10БСП ₂₄	5.19	4.32	2.98	1.14
37	0БСП ₄₈	3.96	3.45	2.85	1.62
38	5БСП ₄₈	5.03	4.13	3.01	1.58
39	10БСП ₄₈	6.45	4.93	3.21	1.41
43	0КП	7.21	5.19	3.52	1.14
44	5КП	10.16	8.64	3.59	1.15
45	10КП	12.18	6.25	2.18	0.78

Заметного поглощения растворенных углеводов стерильными сорбентами (варианты 0-15) не происходит (Фиг. 1 сорбент без микроорганизмов), в то время как биосорбенты, обогащенные микробными ассоциациями (варианты 28-39) проявляют и высокую скорость выделения растворенных углеводов в субстрат, и последующую деструкцию нефти в сорбенте и в воде (Фиг. 1 биосорбент пресный, таблицы 4, 5). Самой высокой степенью разрушения растворенных углеводов отличались варианты с применением микробной массы без сорбентов (варианты 43-45). При этом исходно концентрация растворенных углеводов существенно высокая, что обусловлено наиболее сильным поверхностно-активным эффектом, оказываемым на нефтяной субстрат биосурфактантами препаратов. Отчасти это может быть связано и с исходно более щелочной реакцией среды в морской воде в сравнении с дистиллятом. Это следует иметь в виду и учитывать при проведении работ по очистке неглубоких и непроточных водоемов от нефти, где наиболее оптимальный вариант - простая обработка биопрепаратами.

Этот же прием может быть полезен при очистке от растворенных углеводов вод амбаров и шламонакопителей, а также при доочистке от растворенных углеводов воды в пожарных картах буровых площадок.

При массивованных нефтяных разливах характер и скорость выделения и последующего разложения углеводов будет другим, но общая картина сохранится. В природных водоемах, особенно проточного типа, удаление и рассеивание растворенных нефтепродуктов происходит гораздо быстрее, при этом микробная деструкция нефти в толще сорбента или на поверхности воды без сорбента определит и интенсивность снижения концентрации их в воде.

Исследование скорости разложения непосредственно нефти в опытных вариантах особенно важно, поскольку именно эта сторона для целесообразности разработки и дальнейшего использования технологии является основной.

Для опыта использованы равные концентрации нефти в вариантах. Это позволяет оценивать более реально поведение нефтяного загрязнения в зависимости от способа обработки, чем если бы приводили массу нефти к равным значениям в зависимости от ее концентрации только в сорбированной массе. Оценка идет по общей массе загрязнения на единицу объема материала. В данном опыте на 1 г сорбента использовали 5 г нефти

(средняя величина сорбирующей способности испытанных сорбентов).

В стерильных вариантах (нулевой контроль, сорбенты без микроорганизмов) деструкция нефтяной массы не должна происходить, можно говорить только о процессах физического очищения среды - вымывание растворенных соединений, а также о выделении из массы нефти летучих компонентов. Но последние будут малозначимы из-за низкой температуры среды.

Результаты оценки скорости разрушения нефти в вариантах опыта представлены в таблице 5 и на Фиг. 2-4. Первое, что обращает на себя внимание, температура воды определяет скорость процессов физического очищения водных субстратов от нефти, однако она очень мала в стерильных средах (нулевой контроль) и сорбенты без микробной массы. Скорость поглощения нефти сорбентами без микроорганизмов и их утопления прямо влияет на интенсивность физического очищения субстратов: чем ниже скорость поглощения, тем ниже интенсивность физического очищения водных сред от углеводородов.

Проведенные испытания позволили сделать следующие выводы для обоснования элементов разработанной технологии в конкретных условиях применения.

1. Скорость утопления биосорбентов влияет на глубину первичной деструкции нефти и, чем дольше сорбент находится на поверхности воды, тем более существенно происходит разложение нефти.

2. Скорость утопления сорбентов влияет на интенсивность образования и последующего разложения растворенных углеводородов - чем выше скорость адсорбции нефти в массу сорбента, и последующее утопление, тем быстрее происходит поглощение и растворенной в воде составляющей нефти.

3. В температурном ряду от 0 до +10°C интенсивность разложения нефти возрастает.

4. Разрушение нефтяной массы испытанными биопрепаратами в непроточной среде без применения сорбентов более высока, чем с их применением.

5. Разложение нефти при использовании биосорбентов в пресноводной среде происходит в первые сутки в среднем на 55-60% при температуре 0°C, на 60-70% при температуре до +5 °C и на 70-75% при температуре до +10°C. После утопления в течение 40 суток с момента адсорбции нефтяной массы очистка сорбентов от нефти может происходить под водой на 90-95%.

6. Окисление нефти микробной массой в непроточной системе позволяет снизить концентрацию углеводородов в среде до 96-99% в течение 1,5 месяцев.

35

40

45

Таблица 5 — Динамика снижения общей концентрации нефти в вариантах опыта, г/кг

	В начале опыта	10 суток	20 суток	40 суток
0К ₀	990	989	989	988
5К ₀	990	988	987	987
10К ₀	990	986	985	984
0С ₁	200	195	194	190
5С ₁	200	192	190	183
10С ₁	200	187	182	174
0С ₁₂	200	198	196	193
5С ₁₂	200	197	195	193
10С ₁₂	200	191	187	179
0С ₂₄	200	199	198	196
5С ₂₄	200	195	194	191
10С ₂₄	200	191	189	176
0С ₄₈	200	197	196	193
5С ₄₈	200	193	191	186
10С ₄₈	200	190	187	181
0БСП ₁	200	96	41	21
5БСП ₁	200	84	39	18
10БСП ₁	200	73	35	16
0БСП ₁₂	200	84	31	14
5БСП ₁₂	200	79	32	15
10БСП ₁₂	200	78	32	14
0БСП ₂₄	200	80	28	11
5БСП ₂₄	200	73	21	11
10БСП ₂₄	200	65	18	5
0БСП ₄₈	200	75	35	21
5БСП ₄₈	200	61	29	14
10БСП ₄₈	200	52	21	4
0КП	990	480	134	52
5КП	990	260	98	19
10КП	990	130	74	6

Пример 4. Оценка эффективности очистки воды и донных отложений от нефти в условиях полевого опыта.

Испытание биосорбентов проведены для пресного водоема в летний период. Использованы биосорбенты с периодом плавучести 1 ч. На опытных участках с глубиной до 1,5 м разместили жестко установленные садки, в которые разлили нефть слоем 1 см. Затем садки были обработаны биосорбентами с соответствующими биопрепаратами - для пресноводного объекта использовали препарат Soilin-P.

Оценка изменения параметров загрязнения воды и донных отложений в экспериментальном пресноводном водоеме приведена в таблице 6. Сразу после начала опыта уровень растворенных в воде углеводородов в воде внутри садков возрос от 5 до 10 раз от исходных значений. Однако уже через сутки показатели изменились и стали снижаться. Загрязнение донных отложений произошло в незначительной мере. Так же, как и в воде, разрушение остаточного загрязнения завершилось на третьи сутки опыта.

Таблица 6. Динамика углеводородного загрязнения в пресном водоеме, мг/дм³ (вода), мг/кг, донные отложения

Точка отбора проб	До опыта		Через 20 минут после загрязнения и обработки	Через сутки после опыта		Через 3 суток после опыта	
	вода	донные	вода	вода	донные	вода	донные
Биосорбент	0,05	35	0,34	0,09	35	0,045	22
В 50 м от опытных садков	0,05	26	0,06	0,05	26	0,045	25

Оценка структуры n-алканов в пробах донных отложений показала (Фиг. 3), что за 3 месяца опыта произошло существенное изменение состава этой фракции в пробах донных отложений и снижение общей массовой доли n-алканов.

Площадь каждого садка составила 7 м², внутрь каждого из них вылили по 7 л нефти. Слой пленки на поверхности воды внутри садков составил 1 см. Температура воды +5 - +10°C.

Здесь мы смогли визуальнo и в динамике отследить внешние параметры технологии очистки поверхности воды с помощью сорбентов достаточно быстро (в течение нескольких часов). В первую очередь, обратило внимание то, что сразу после загрязнения во всех садках также, как и за их пределами образовались устойчивые радужные пленки. После обработки загрязненной нефтью поверхности воды биосорбентами радужные пленки стали "рваться" и через 3 ч исчезли. Повторный отбор проб воды и донных отложений провели через 4 дня после опыта. Как можно видеть из представленных данных, загрязнение растворенными углеводородами отмечено в воде сразу после закладки опыта, концентрация в воде внутри садков возросла в среднем в 10 раз. Однако через 4 суток параметры пришли в норму к исходным значениям. Через 4 суток уровень загрязненности донных отложений также снизился до исходных значений и не превышал фоновых величин.

Анализ структуры алкановой фракции в пробах донных отложений солоноватоводного водоема показал, что за 2 месяца опыта общая концентрация n-алканов снизилась в 9,5 раз, при этом структура этой фракции претерпела существенные изменения, которые характеризовались резким снижением в составе фракции концентрации углеводородов с длиной цепи C₁₇-C₂₁ и C₂₃-C₃₃ (Фиг. 4).

До опыта и после него была проведена оценка состояния водной фауны в опытных водоемах. В видовом составе пресноводного объекта до опыта (в мае), через месяц после испытаний (в июле) и через 3 месяца (в сентябре) доминировали малоцетинковые черви - олигохеты. Их доля в выборке составляла в мае 75,3%. В июле, в период массового развития личинок насекомых с водным этапом развития доля олигохет снизилась до 54,5%, а в августе, после вылета насекомых, доля олигохет вновь вернулась к состоянию на начало вегетационного периода и составила 79,7%.

Общая численность беспозвоночных в озере в конце предыдущего перед закладкой опыта вегетационного сезона (6378 экз./м²) была сопоставима с таковой для начала вегетационного сезона непосредственно перед опытом - 6360 экз./м². Динамика численности и видового состава беспозвоночных в бентосе озера в вегетационный период была типичной для малого водоема северных широт. Влияния внесения углеводородов на пресноводный водный объект по составу и количеству водных

беспозвоночных не было отмечено. Это, в свою очередь, говорит об отсутствии негативного воздействия осажденного на дно водоемов отработанного биосорбента с нефтью и его безопасности для экологического состояния водоемов в процессе продолжающейся биодеструкции нефти в толще биосорбентов.

5 Таким образом, получен технический результат эффективной очистки поверхности воды, толщи воды и донных отложений от нефти при использовании частично гидрофобных биосорбентов с комплексом нефтеокисляющих культур психрофильных микроорганизмов.

10 Пример 5. Очистка поверхности льда и ледяной шуги от нефти на примере загрязненного нефтью участка.

Для испытаний был выбран загрязненный в результате аварийного разлива нефти заболоченный участок, который локализован в зимний период глинистой отсыпкой. Весной после таяния снега внутри отсыпки образовался водоем, на поверхности которого был загрязненный нефтью лед, плавающая нефть и ледяная шуга. Температура 15 воды подо льдом на момент начала испытания составляла +1 - +2°C. Слой нефти на поверхности льда и воды от 0.5 до 2 см. Перед опытом взяли пробы воды и донного грунта для определения концентрации загрязняющих веществ. Уровень растворенных углеводородов в воде участка составлял 18-20 мг/дм³, концентрация хлоридов до 7500 мг/дм³. Загрязнение донного грунта составило в разных точках участка от 80000 до 20 460000 мг/кг. Поверхность загрязненного участка обработали биосорбентом, инокулированным биопрепаратом Soilin-P, с периодом плавучести 48 ч. Площадь обрабатываемого участка 2 га, масса использованного для обработки сухого биосорбента - 100 кг. Обработка проводилась путем смешивания готового сорбента с 25 водой в приемной емкости, куда дозировано подавали воду из того же водоема и сорбент, распыление взвеси вели из мотопомпы направленной струей на загрязненные фрагменты участка. При этом происходило смешивание сорбента с нефтью на поверхности льда и ее адсорбция в массу сорбента. Шуга льда, загрязненная нефтью, пропитывалась плавающим сорбентом, на открытых участках воды происходила 30 сорбция нефтяной массы в толщу сорбента. Через полчаса после обработки практически вся поверхностная нефть была поглощена в массу внесенного биосорбента. Через 2 дня сорбент осел на дно, а лед и вода на участке визуально очистились от нефти. При этом также на поверхности воды перестали фиксировать радужные пленки. В течение летнего периода вели регулярный мониторинг состояния воды и донного грунта 35 опытного участка. Результаты измерения приведены в таблице 8. Температура воды участка в течение летнего сезона не повышалась более чем до +10°C. на дне водоема до конца лета местами фиксировали лед. Глубина водоема составляла от 1 до 2 м.

В начале периода наблюдений с после обработки при увеличении температуры воздуха наблюдали увеличение концентрации растворенных в воде углеводородов, что 40 могло быть связано с высокой концентрацией нефти в массе донных отложений и выделением углеводородов в толщу водного объекта. За 2 месяца с начала опыта уровень растворенных в воде углеводородов в воде участка снизился в 100 раз, донные отложения очистились от нефти на 90%.

45 Таким образом, получен технический результат эффективной очистки от нефти поверхности льда, ледяной шуги, воды и массы донных отложений при использовании биосорбентов с комплексом толерантных к солевому загрязнению психрофильных микроорганизмов в составе комплексного биопрепарата Soilin-P в температурном диапазоне от 0 до +10°C в промышленных условиях.

Таблица 7. Динамика загрязнения на опытном участке в течение 3 месяцев наблюдений

Длительность опыта, суток	Концентрация растворенных углеводородов, мг/дм ³	Концентрация нефти в донных отложениях, средняя из разных точек участка, мг/кг	Визуальные характеристики участка
До опыта	20	250000	Загрязненные лед, вода, шуга льда, радужные пленки
10	36	230000	Очищенная от нефти поверхность льда и воды без радужных разводов, вода мутная
30	15	135000	Радужные разводы отсутствуют, местами фиксируются микробные пленки, вода мутная
60	2,5	75000	Над поверхностью воды появилась водная растительность, вода становится прозрачной
90	0,2	24000	Хорошо развитая водная растительность на фоне прозрачной воды участка

Пример 6. Очистка от нефти береговой зоны водных объектов.

Для испытаний выбрали хронически загрязненную территорию замазученного берега реки С. Двина, над которой выше по ландшафту расположен старый нефтешламонакопитель, - постоянный источник мобильного загрязнения для реки. Задачей этих испытаний было продемонстрировать некоторые возможности способа, а именно - целесообразность применения технологии обработки загрязненной нефтью поверхности береговой зоны частично гидрофобным биосорбентом для ликвидации последствий загрязнения водных объектов, которые зачастую сопровождаются выносом нефти на берег, и приводят к глобальным нарушениям экологического равновесия. Одной из главных проблем в таких ситуациях является загрязнение животных и птиц, которое приводит к их гибели, а также необходимость уборки нефти с поверхности для снижения риска выноса загрязняющих веществ в воду в процессе вымывания и биоразрушения. Вдоль загрязненного берега на воде фиксировались устойчивые радужные пленки, в массе донных отложений высокие концентрации нефтепродуктов. Концентрация нефти в пробах донных отложений составила 670 мг/кг, что в 20 раз выше фоновых величин. Уровень растворенных нефтепродуктов достигал 1,8 мг/дм³. Концентрация нефти в пробах грунта с берегового откоса достигала 750000 мг/кг, при этом приток нефти в воду реки был постоянный.

Обработку загрязненной части берега провели из помпы смесью биосорбента с периодом плавучести 1 ч с препаратом Soilin-P. Сорбированная нефть на берегу в отличие от исходной перестала налипать на обувь и инвентарь, не оставляла следов на руках. Во время волнообразования часть сорбированной нефти попала в воду реки. При этом наблюдали эффект разрывания радужных пленок на поверхности воды загрязненной территории. Через час радужные пленки практически исчезли. Сорбент сел на дно. Точки наблюдений зафиксировали вешками и затем на протяжении 2-х месяцев вели наблюдение за параметрами воды и донного грунта по концентрации углеводородов. Через сутки после проведения испытаний на воде отсутствовали ранее

фиксируемые нефтяные пятна, береговая зона очистилась от сорбента и нефти в результате приливных явлений, а образования новых подтеков нефти на этом фрагменте далее не фиксировали. Через месяц концентрация растворенных в воде углеводородов на участке не поднималась выше 0,07 мг/дм³, через 2 месяца была не более 0,04 мг/дм³.
5 Стенки обработанного берега заросли водорослями, концентрация нефтяного загрязнения снизилась за 2 месяца до 9000 мг/кг, а концентрация углеводородов в донных отложениях достигла 31 мг/кг.

Технический результат, полученный в ходе испытаний, - улучшение экологической ситуации на загрязненных нефтью береговых зонах водных объектов, который состоит
10 в ликвидации эффекта налипания нефти после ее сорбции в массу биосорбента на предметы и на живые организмы, ускорение биологической деструкции нефти в массе биосорбента, упрощение процедуры ликвидации последствий незначительных разливов на водных объектах за счет самоликвидируемости отработанных биосорбентов и
15 эффективную очистку береговой зоны с массивированным нефтяным загрязнением с последующим удалением биосорбента на изолированную площадку для обеспечения биодеструкции нефти в стационарных условиях без контакта с природными водными экосистемами.

Формула изобретения

20 1. Способ очистки от нефти и нефтепродуктов пресноводных объектов и экосистем, включающий контактирование подлежащих разложению углеводородов нефти со штаммами нефтеокисляющих микроорганизмов, отличающийся тем, что используют биопрепарат, состоящий из смеси нефтеокисляющих штаммов культур *Microbacterium species* ВКМ Ас-2614D, *Pseudomonas migulae* ВКМ В-2761D, *Rhodococcus erythropolis*
25 ВКМ Ас-2612D, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2611D, взятые в соотношении 1:1:1:1 с титром клеток в готовом препарате не менее 10¹⁰ клеток на 1 г.

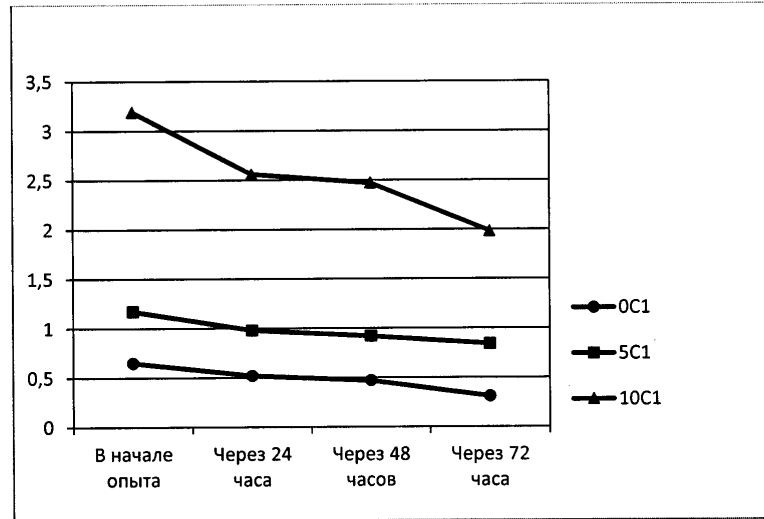
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для очистки от нефти водных объектов используют биопрепарат, иммобилизованный на частично гидрофобном носителе -
30 торфяном сорбенте.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что для очистки от нефти поверхности льда и ледяной шуги при температуре от 0 до +10°C на водных объектах используют биопрепарат, иммобилизованный на частично гидрофобном торфяном сорбенте с периодом плавучести 48 ч.

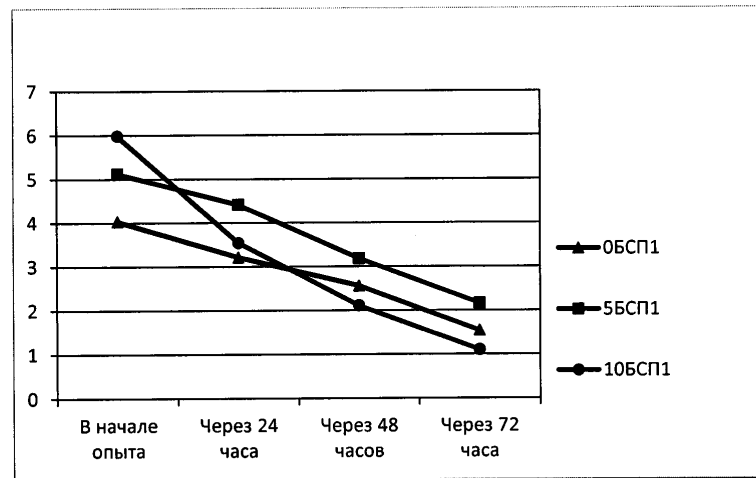
4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что для очистки от нефти береговой зоны
35 водных объектов используют биопрепарат, иммобилизованный на частично гидрофобном торфяном сорбенте с периодом плавучести 1 ч.

5. Способ по п. 2, отличающийся тем, что для очистки от нефти донных отложений водных объектов используют биопрепарат, иммобилизованный на частично
40 гидрофобном торфяном сорбенте с периодом плавучести 12-24 ч.

Влияние температуры среды на интенсивность образования и последующего снижения растворенных нефтепродуктов по вариантам опыта



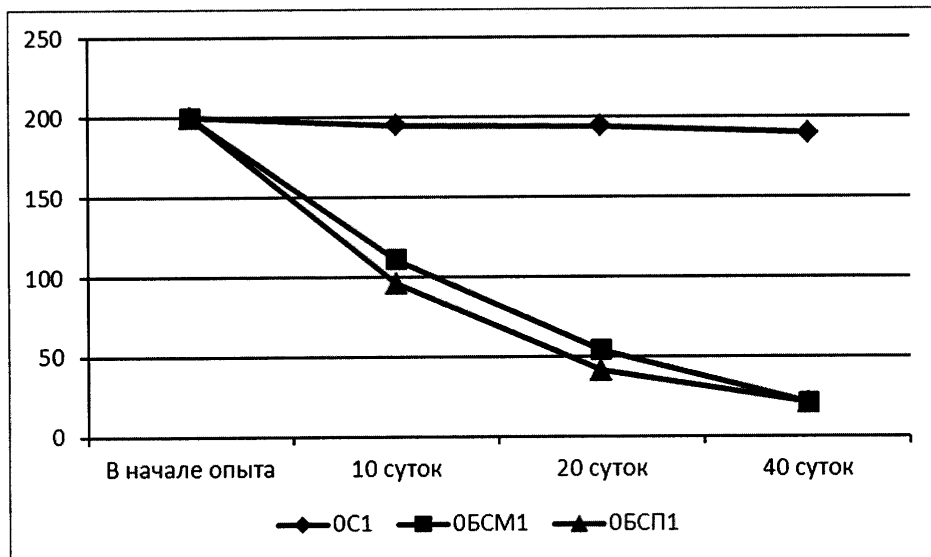
1 – сорбент без микроорганизмов



2 – биосорбент пресный

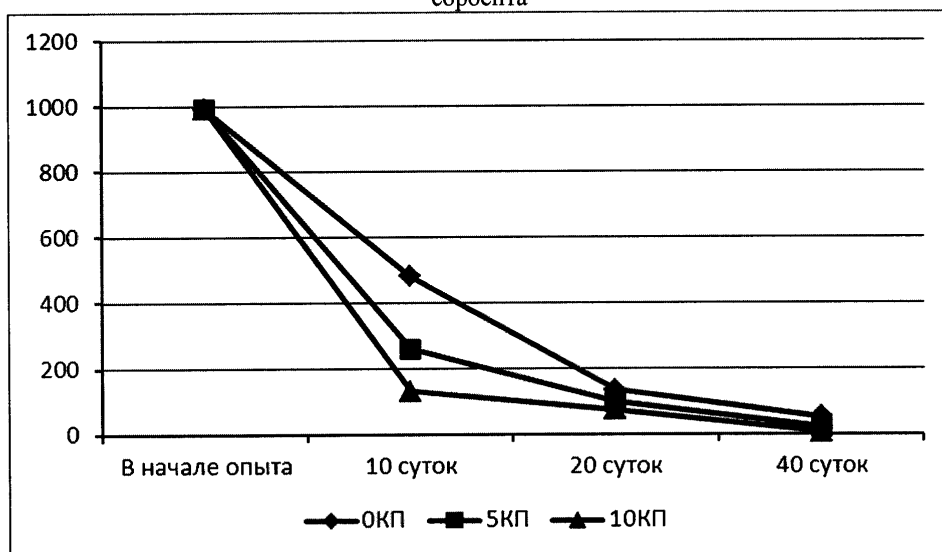
ФИГ.1

Сравнительные данные по скорости очистки сорбентов и биосорбентов при нулевой температуре



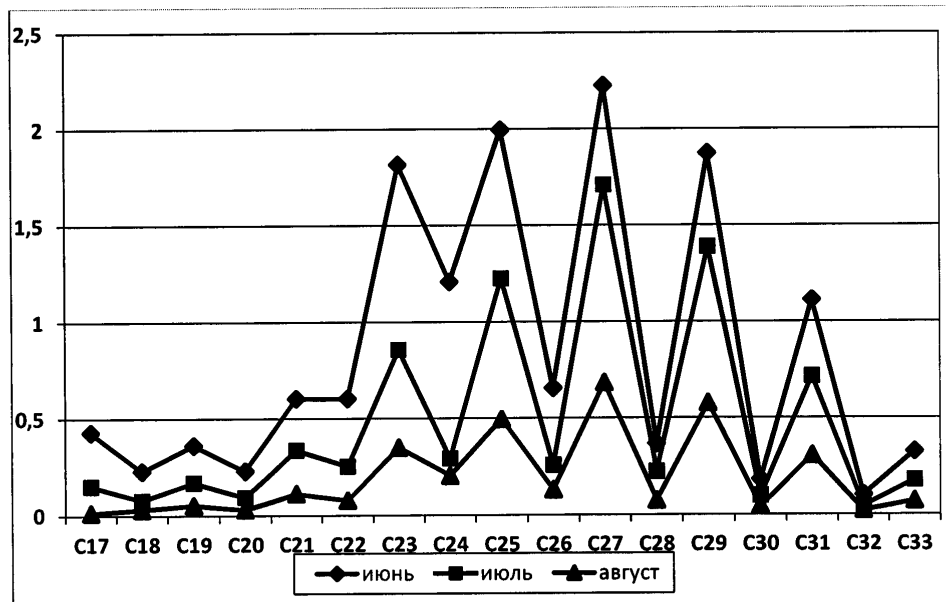
Фиг. 2

Влияние температуры среды на скорость разрушения нефти в пресноводной культуре без сорбента



Фиг.3

Динамика изменения структуры алкановой фракции нефти в пробах донных отложений на участке, обработанном биосорбентом с комплексом культур *Soilin-P*



Фиг. 4