



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **133505** (13) **U**
(51) МПК
C12N 11/02 (2006.01)
C12N 11/04 (2006.01)
C02F 1/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2018 10889	(72) Винахідник(и): Черниш Єлізавета Юріївна (UA), Пляцук Леонід Дмитрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.11.2018	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2019	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2019, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ГРАНУЛЬОВАНОГО НОСІЯ, ЩО МІСТИТЬ ІММОБІЛІЗОВАНІ МІКРООРГАНІЗМИ

(57) Реферат:

Спосіб отримання гранульованого носія містить іммобілізовані мікроорганізми, який включає іммобілізацію мікроорганізмів у вигляді суспензії у 3-5 % розчині альгілату натрію масовою часткою 3-5, до якого додають фосфогіпс, що є відходом хімічної промисловості, гранулювання, яке здійснюють в обертовому тарільчастому грануляторі зі змішуванням іммобілізованих мікроорганізмів з мінеральним порошком, який виготовлений на основі золи виносу теплової електростанції (ТЕС) масовою часткою 7-10, при швидкості обертання тарілки 70-80 об./хв. та часі гранулювання, який складає 10-30 хвилин, та отримання гранул з модифікованою поверхнею, згідно з корисною моделлю, концентрацію суспензії мікроорганізмів забезпечують не менше 10^{10} - 10^{12} КУО/г гранул при внесенні в альгілат натрію на рівні 10-14 мас. ч., а як суспензію мікроорганізмів використовують асоціацію видів фосфатмобілізуючих мікроорганізмів - *Bacillus* sp. (*B. polumyxa* та *B. subtilis*), при цьому фосфогіпс додають на рівні 15-30 масових часток, а гранули отримують діаметром 3-4 мм.

UA 133505 U

Корисна модель належить до біотехнології та екології, зокрема до способів отримання іммобілізованих мікроорганізмів в гранулах придатних для використання в системах біологічного очищення стоків з видаленням сполук фосфору та покращення фосфатного живлення рослин в сільському господарстві.

5 У порівнянні з хімічними засобами, що застосовуються в сільському господарстві, мікробіологічні добрива за ступенем впливу на організм належать до речовин 4-го класу небезпеки; екологічно безпечні, нетоксичні для людини і теплокровних тварин; при застосуванні не утворюють токсичних сполук у повітрі та стічних водах.

10 Іммобілізація мікроорганізмів на мінеральному носії виконує протекторну функцію для захисту мікроорганізмів в токсичних компонентах забрудненого середовища і продуктів власне їх метаболізму, і сприяє формуванню стійкої мікробної асоціації. Слід відзначити, що біоплівка є складною поверхнею, що пов'язана з інтерфейсами мікробних асоціацій, сформованих відповідно до конкретних умов навколишнього середовища, такими як доступність поживних речовин і кисню. Труднощі при використанні іммобілізованих клітин обумовлені утворенням
15 деяких побічних продуктів, а також виникненням додаткового дифузійного бар'єра для субстрату і продукту, яким є клітинна стінка та цитоплазматична мембрана. У порівнянні з гомогенним біокаталізом, що відбувається в однорідному середовищі, гетерогенний має ряд переваг. Так, виникає можливість здійснення безперервних процесів очищення, збільшується термін експлуатації біокаталізатора, знижується кількість відходів або побічних продуктів. До гетерогенних біокаталізаторів належать ізольовані ферменти або цілі клітини мікроорганізмів,
20 іммобілізовані на поверхні нерозчинного носія методом адсорбції або ковалентного зшивання, або в масі носія шляхом включення в структуру гелю або інкапсуляції. Більшість досліджень про дифузію субстратів та кисню в іммобілізованих клітинах застосовуються для шару альгінату та к-карагенану.

25 Відомий спосіб отримання бактеріального добрива [Євразійське патентне відомство № 021467, МПК C05F 11/08 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01) C12R 1/00 (2006.01), 2015], в якому бактеріальне добриво містить клітини штамів бактерій *Bacillus*, сорбент і залишки культуральної рідини з метаболітами, при цьому містяться клітини штамів бактерій *Bacillus subtilis* B-1 і *Bacillus megaterium* BM-1 і додатково *Azotobacter chroococcum* A-2,
30 *Pseudomonas putida* PP- 1, *Streptomyces atratus* UZGIT-1, як сорбент використовується суміш біогумусу і карбоксиметилцелюлози, що взяті в масовому співвідношенні рівному (3-5):(0,5-1,5) відповідно, при наступному співвідношенні компонентів, на 1 г добрива: 2 клітини штаму бактерій.

35 До недоліків цього способу належить відсутність дослідження якісних характеристик біогумусу, відсутні дані щодо сировини, з якої він був вироблений, що впливає на наявність в ньому не тільки поживних речовин, але й можливих токсичних компонентів. Крім того, біогумус може містити контамінантну мікрофлору, що впливає на ріст і розвиток культивованих штамів *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. Крім того, вплив метаболітів на культури вищезазначених мікроорганізмів лімітують характер, що може гальмувати їх розвиток
40 при внесенні в ґрунт гранул бактеріального добрива.

Відомий засіб для мікробіологічного захисту рослин [Патент РФ № 2539 025, МПК A01N 63/00 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01), 2013], що включає суміш культуральних рідин *Trichoderma viride*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* з необхідною кількістю води при співвідношенні культур в суміші 1:1:1:1 при титрі кожної
45 культури не менше 1×10 КУО/мл.

Відомий спосіб мікробіологічного захисту рослин з використанням вищезазначеного засобу, включає 2-3-кратне обприскування рослин в період вегетації в дозуванні 12,5 л засобу на 1 га посівів, при досягненні середніх температур повітря не нижче 15 °С, з інтервалом два-три тижні.

50 Основним недоліком відомого способу є рідка форма його внесення в ґрунт, що сприяє процесам евапорації і збільшення витрат препарату з меншою ефективністю. Таке внесення має ряд обмежень, пов'язаних з температурним режимом, вологістю і рН середовища, що впливає на процес розвитку потрібних видів мікроорганізмів. При цьому такі біопрепарати мають короткі терміни збереження при транспортуванні на далекі відстані і високий відсоток загибелі живих, активних бактеріальних клітин, що теж необхідно враховувати при дозуванні
55 відомого засобу.

Відомий спосіб отримання гранульованих бактеріальних препаратів [патент України № 17715, МПК C05F 11/08 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01), 1997], що включає вирощування культур мікроорганізмів, змішування їх суспензії з наповнювачем і гранулювання отриманої маси, при цьому як наповнювач використовують глинисті мінерали, переважно монтморилоніт, що вносять
60 в культуральну рідину в масовому співвідношенні 1,2-2,0:1,0. При цьому глинисті мінерали

вносять у два прийоми, причому на першому етапі їх задають в межах 0,1-2,0 % від маси суспензії мікроорганізмів, а потім основна кількість мінералу, після чого отриманий композит гранулюють. Для видалення вологи з поверхні отриманих гранул і їх підсушування гранули приводять у контакт з порошком висушеного стерильного глинистого мінералу, потім їх підсушують протягом години на повітрі, відокремлюють від пилоподібних частинок відомим способом і стерильно розфасовують.

До недоліків відомого способу належить енергоємність процесу виробництва гранул при етапному внесенні глинистого матеріалу, а також необхідно враховувати властивості використаного мінералу або гірської породи, його міцності при стисненні, що впливає на якість збереження і транспортування гранул, а також на ефективність їх використання надалі. Монтморилоніт вважається дешевою сировиною. Але кінцеві продукти, не завжди конкурентоспроможні, адже в ціноутворенні враховується екологічна безпека сировини і його походження. Крім того, у композиційному складі гранул відсутні компоненти підживлення мікроорганізмів в початковій стадії лаг-фази їх росту при інтродукції в ґрунт, що також може вплинути на ефективність використання цього бактеріального препарату.

Як найближчий аналог взято спосіб отримання гранульованого носія, що містить іммобілізовані мікроорганізми, який включає іммобілізацію мікроорганізмів у вигляді суспензії у гелеутворюючому реагенті, за який використовують 3-5 %-ний розчин альгінату натрію, до якого додатково додають фосфогіпс, що є відходом хімічної промисловості; гранулювання здійснюють в обертовому тарільчастому грануляторі зі змішуванням іммобілізованих мікроорганізмів з мінеральним порошком, який виготовлений на основі золи виносу теплової електростанції (ТЕС) і має підвищену водостійкість, при швидкості обертання тарілки 70-80 об./хв. та часі гранулювання - 10-30 хвилин з отриманням гранул із модифікованою поверхнею діаметром 4-5 мм, при вихідному співвідношенні компонентів, масових часток: 3-5 % розчин альгінату натрію 3-5, фосфогіпс 11-20, порошок, що виготовлений на основі золи виносу ТЕС 7-10. Потім отримані гранули сушать протягом щонайменше шести годин при температурі 25-30 °С. При цьому вологість суміші при змішуванні іммобілізованих мікроорганізмів з мінеральним порошком на основі золи виносу ТЕС підтримують на рівні до 35 % г [пат. України на винахід 114664, МПК С12N11/02, С12N11/04; С02F 1/28, 2017].

Концентрація суспензії мікроорганізмів необхідної еколого-трофічної групи забезпечується на рівні 10^8 - 10^9 КУО/ г гранул. Як суспензію мікроорганізмів необхідної еколого-трофічної групи використовують ацидофільну асоціацію видів тіобацил - *Thiobacillus thiooxidans* та *Thiobacillus ferrooxidans*.

Основним недоліком найближчого аналога є те, що спосіб виявляє загальні особливості процесу іммобілізації різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів та потребує уточнення основних технологічних параметрів процесу іммобілізації при використанні для конкретних біохімічних процесів очищення компонентів середовища.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення існуючого способу отримання гранул, що містять іммобілізовані мікроорганізми шляхом оптимізації розміру гранул мінерального носія з урахуванням процесів внутрішньої абсорбції та біоокислення для отримання носія іммобілізованих клітин фосфатмобілізуючих мікроорганізмів, що дає можливість використовувати гранульований носій, що заявляється в системах біологічного очищення стоків з видаленням сполук фосфору та для виробництва біопрепаратів для покращення фосфорного живлення рослин в сільському господарстві. При цьому досягається екологічний ефект, що полягає в зменшенні рівня техногенне навантаження на довкілля від місць накопичення промислових відходів.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі отримання гранульованого носія, що містять іммобілізовані мікроорганізми, який включає іммобілізацію мікроорганізмів у вигляді суспензії у 3-5-ому % розчині альгінату натрію масовою часткою 3-5, до якого додають фосфогіпс, що є відходом хімічної промисловості, гранулювання, яке здійснюють в обертовому тарільчастому грануляторі зі змішуванням іммобілізованих мікроорганізмів з мінеральним порошком, який виготовлений на основі золи виносу теплової електростанції (ТЕС) масовою часткою 7-10, при швидкості обертання тарілки 70-80 об./хв. і часі гранулювання - 10-30 хвилин та отримують гранули із модифікованою поверхнею, і згідно з корисною моделлю, концентрацію суспензії мікроорганізмів забезпечують не менше 10^{10} - 10^{12} КУО/ г гранул при внесенні в альгінат натрію на рівні 10-14 мас.ч., а як суспензію мікроорганізмів використовують асоціацію видів фосфатмобілізуючих мікроорганізмів - *Bacillus* sp. (*B. pumilus* та *B. subtilis*), при цьому фосфогіпс додають на рівні 15-30 масових часток, а гранули отримують діаметром 3-4 мм.

Концентрація суспензії мікроорганізмів необхідної еколого-трофічної групи забезпечується на рівні не менше 10^{10} - 10^{12} КУО / г гранул при внесенні в альгінат натрію на рівні 10-14 мас.ч.,

що дозволяє досягти стабільно високих показників виділення фосфат-іонів у розчин (більше 80 %) у процесі мінералізації органічної речовини. При внесенні в альгінат натрію суспензії клітин менше ніж 10 мас.ч. не дозволяє досягти рівномірного розподілу життєздатних клітин у масі альгінату, що впливає на подальшу ефективність використання гранул як біопрепарату.

Збільшення масової частки клітинної суспензії до 15 мас.ч. є економічно не доцільним, так як не впливає на ефективність біопрепарату.

При цьому як суспензію мікроорганізмів необхідної еколого-трофічної групи використовують асоціацію видів фосфатмобілізуючих мікроорганізмів - *Bacillus* sp. (*B.polutuxa* та *B.subtilis*). що дозволяє використовувати отримані гранули для покращення фосфатного живлення рослин в сільському господарстві.

Порівняння активності мінералізації органічних сполук фосфору у виділених фосфатмобілізуючих бактерій за біоінформаційними базами даних, дозволило зробити висновок про більш високу активність мінералізації органічних сполук фосфору саме видами *B.polutuxa* та *B.subtilis*, що й були застосовані для формування біокаталітичної основи гранульованого носія.

У способі, що пропонується, як добавка до альгінату натрію на стадії змішування вноситься фосфогіпс. При додаванні його менше 15 мас.ч. не вдається досягти гомогенізації суміші компонентів при збільшенні концентрації суспензії мікроорганізмів у розрахунку не менше 10^{10} - 10^{12} КУО на 1г гранул та не дозволяє забезпечити нахождение необхідної кількості макро- та мікроелементів для розвитку фосфатмобілізуючих бактерій. Збільшення масової частки фосфогіпсу дозволяє утилізувати більші об'єми цього відходу, що є важливим для покращення екологічної ситуації в місцях відкритого складування фосфогіпсу у відвалах, при цьому здійснюється перетворення компонентів фосфогіпсу, переведення у рухому форму сполук фосфору. Але при зростанні його вмісту більше 30 мас. ч. не відбувається подальшого зростання швидкості метаболітичної активності фосформобілізуючих мікроорганізмів, тому визначено раціональний вміст фосфогіпсу у гранулах в діапазоні від 15 до 30 мас.ч.

Результати дослідження показують, що максимальне виділення фосфат-іонів у розчин досягало рівня 97 % при використанні гранул, що мають діаметр не більше 3-4 мм. Гранули, що мають розмір 3-4 мм, показали кращу здатність до біовиділення фосфатів в порівнянні з більш великим розміром, з діаметром більше 4-4,5 мм. У міру збільшення розміру гранул збільшується витік біомаси з іммобілізованого носія. Для гранул з великим розміром (до 5 мм) витік клітин був більший, ніж для всіх наступних з діаметром до 4 мм. Ефективність використання гранул діаметром 1-2 мм як біокаталітичних систем в процесі дефосфотації стоків склала не більше 70 %, що пов'язано із зменшенням сорбційної поверхні отриманого гранульованого носія.

Спосіб включення клітин у гранульований носій, що заявляється, дає переваги завдяки таким властивостям, як простота приготування гранул, відносна дешевизна, можливість включення клітин будь-якого розміру і заданої кількості, пружність фіксації клітин, пружність гранул на стирання і розрив (властивість, необхідна для реакторів з перемішуванням), що дає можливість використовувати мінеральне завантаження, що заявляється, не тільки в природному середовищі для його очищення, але й в біотехнологічних системах очищення стоків та мулових осадів.

Отже, корисна модель, що заявляється, направлена на уточнення композиції для формування гранульованого носія за аналогом, що дозволить ефективно застосовувати носій у системах біологічного видалення сполук фосфору та виробництва біопрепаратів для покращення фосфорного живлення рослин в сільському господарстві. При цьому спосіб, що заявляється, направлений на зниження рівня техногенного навантаження на довкілля від фосфогіпсових відходів та розширення сфери їх утилізації в екологічній біотехнології.

Приклад

Отримання мінерального гранульованого носія для системи біологічного виділення сполук фосфору із стоків та мулових осадів (біопрепарату).

Для культивування фосфатмобілізуючих бактерій використовували модифіковане елективне живильне середовище Муромцева наступного складу (в г/л): глюкоза - 10,0; аспарагін - 1,0; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - 1,0; фосфогіпс - 0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,07; K_2SO_4 - 0,2; агар-агар - 20,0; рідка фаза мулових осадів - 1 л. При цьому джерелом фосфору для бактерій в ньому слугував важкорозчинний ортофосфат кальцію та фосфогіпс. Посіви інкубували за температури 30 °C протягом 3 діб.

У суспензію клітин двох видів *B.polutuxa* та *B.subtilis* при температурі 30-35 °C (12 мас.ч.), 10^{10} - 10^{12} КУО/г гранул вносять попередньо приготовлений 3 % розчин альгінату натрію (5 мас. ч.) при постійному перемішуванні в змішувачі при швидкості обертання мішалки 80 об./хв. Процес змішування продовжують протягом однієї хвилини (до отримання однорідної маси).

Потім, як добавка додається фосфогіпс (табл. 1), що утворився на підприємстві ВАТ "Сумихімпром" у вигляді капілярного пористого матеріалу з фіксованою структурою з діаметром пор 0,1-1,5 мкм. (25 мас.ч.) і процес змішування продовжують протягом однієї хвилини.

Таблиця 1

Склад фосфогіпсу в оксидній формі, %

CaO	SO ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅
28-36	52-61	0,1-0,2	0,1-0,3	1,2-1,9	0,3-1,3

5

Процес обробки (перша стадія - змішування) виконують у мезофільному режимі, тобто протягом всього процесу підтримують температуру на рівні 30 °С, що сприятиме збереженню бактеріальної популяції та її швидкому росту в процесі біологічного окислення забруднюючих речовин і для отримання однорідної маси сам процес змішування проводиться протягом п'яти хвилин з формуванням напівпродукту. На другій стадії відбувається гранулювання напівпродукту з порошком, що виготовлений на основі золи виносу ТЕС (табл. 2), в тарільчастому грануляторі відбувається для отримання гранул діаметром 3-4 мм.

10

На стадії гранулювання напівпродукт обробляють порошком із золи виносу протягом 15 хвилин при 25 °С.

15

Таблиця 2

Хімічний склад золи виносу (% мас.)

Компоненти	Вміст, % мас.	Компонент	Вміст, % мас.
SiO ₂	52,2-64,3	MgO	1,0-2,0
Al ₂ O ₃	23,5-29,0	K ₂ O	1,0-2,3
Fe ₂ O ₃ (3+)	6,0-10,0	SO ₂	0,2-0,8
FeO (2+)	0,8-1,5	P ₂ O ₅	0,2-1,0
TiO ₂	0,6-1,0	MnO	0,3-0,4
CaO	2,2-5,8	C (вуглець)	12,0-16,0

Після завершення перемішування отримані гранули протягом 2 годин витримують в порожнині гомогенізатора для завершення затвердіння гелю в гранулах (хімічної реакції заміщення іонів натрію на іони кальцію).

20

Спосіб відповідно забезпечує отримання гетерогенного біокатализатора, що є іммобілізовані в шарі носія клітини фосфатмобілізуючих бактерій, при цьому основа гранульованого мінерального носія, виготовлена із фосфогіпсу і золи виносу ТЕС, тобто відходів хімічної промисловості та паливно-енергетичного комплексу, що дозволяє зменшити техногенне навантаження на довкілля від місць накопичення та складування цих відходів, та по композиції гранули являють собою кінцевий продукт, що з високою ефективністю може використовуватися в біологічному очищенні стоків та мулових осадів від сполук фосфору та як біопрепарат для покращення фосфорного живлення сільськогосподарських культур.

25

Біопрепарат або бактеріальне добриво, що пропонується, може замінити дорогі і екологічно небезпечні хімічні препарати для обробки рослин.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання гранульованого носія, що містить іммобілізовані мікроорганізми, який включає іммобілізацію мікроорганізмів у вигляді суспензії у 3-5 % розчині альгінату натрію масовою часткою 3-5, до якого додають фосфогіпс, що є відходом хімічної промисловості, гранулювання, яке здійснюють в обертовому тарільчастому грануляторі зі змішуванням іммобілізованих мікроорганізмів з мінеральним порошком, який виготовлений на основі золи виносу теплової електростанції (ТЕС) масовою часткою 7-10, при швидкості обертання тарілки 70-80 об./хв. та часі гранулювання, який складає 10-30 хвилин, та отримання гранул з модифікованою поверхнею, який **відрізняється** тим, що концентрацію суспензії мікроорганізмів забезпечують не менше 10¹⁰-10¹² КУО/г гранул при внесенні в альгінат натрію на рівні 10-14 мас. ч., а як суспензію мікроорганізмів використовують асоціацію видів фосфатмобілізуючих

35

40

мікроорганізмів - *Bacillus* sp. (*B. polymyxa* та *B. subtilis*), при цьому фосфогіпс додають на рівні 15-30 масових часток, а гранули отримують діаметром 3-4 мм.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601