



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88997

(13) C2

(51) МПК (2009)

C12M 1/24

C12M 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АПАРАТ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

1

(21) а200810414

(22) 15.08.2008

(24) 10.12.2009

(46) 10.12.2009, Бюл.№ 23, 2009 р.

(72) ЗАЛЕВСЬКИЙ ВАЛЕР'ЯН СЕРГІЙОВИЧ, ПА-
ТЮК ЛЕОНІД КАРПОВИЧ(73) ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ
ІМ. А.В. ДУМАНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-
МІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) SU 1497208 A1, 30.07.1989

UA а200613384 C2, 26.08.2008

SU 424877 A, 25.04.1974

SU 193418 A 13.03.1967

SU 412242 A 25.01.1974

JP 09028371 A 04.02.1997

SU 708696 A, 15.11.1986

RU 2322488 C2, 20.04.2008

RU 2021353 C1, 15.10.1994

JP 03160983 A, 10.07.1991

Виестур У.Э. и др. Системы ферментации. - Рига:
Знание, 1986. - С. 59(57) 1. Апарат для культивування аеробних мікро-
організмів, що включає ємність з технологічними

2

патрубками та розміщеним в останній аератором, систему зовнішньої рециркуляції, що складається з трубопроводу відведення, спонукальника витрат і трубопроводу підведення та ежектора, розташованого на трубопроводі підведення, який **відрізняється** тим, що апарат додатково обладнаний дозатором рідкого вуглеводного субстрату, установленим перед спонукальником витрат, дозатором суміші парів вуглеводного субстрату і повітря з патрубком підведення повітря та патрубком відведення суміші, який з'єднано з камерою змішування ежектора, останній з'єднано з аератором, система рециркуляції обладнана колоною, з'єднаною з ємністю, причому усередині ємності і колони розміщена насадка.

2. Апарат за п. 1, який **відрізняється** тим, що дозатор суміші парів вуглеводного субстрату і повітря включає корпус з кришкою і висувний шибер.

3. Апарат за п. 2, який **відрізняється** тим, що в корпусі дозатора суміші парів вуглеводного субстрату і повітря розміщений матеріал для просякнення вуглеводним субстратом.

Винахід відноситься до області мікробіології, зокрема, до апаратів для вирощування мікроорганізмів - деструкторів речовин, що важко піддаються біоокисленню, наприклад, вуглеводнів та може бути використаний в природоохоронних біотехнологіях для очистки забруднених поверхневих, підземних та стічних вод, донних відкладень, забруднених ґрунтів, ремедіації територій.

Відомий апарат для вирощування аеробних мікроорганізмів (Виестур У.Э. и др. Системы ферментации. Рига, 1986, с. 59) [1].

Апарат містить вертикальний циліндричний корпус з технологічними патрубками, центральню установлений в ньому дифузор, систему рециркуляції культуральної рідини, що включає зовнішні циркуляційні труби та підключений до них у нижній частині корпусу ежектор для подачі повітря, камера змішування якого розташована співвісно дифузору.

Апарат працює таким чином. Через технологічні патрубки в корпус заливають поживне середовище, засівають відповідну культуру мікроорганізмів і подають повітря в сопло ежектора. Дисперговане в ежекторі повітря надходить у середину дифузора, в результаті чого в об'ємі корпусу за рахунок ефекту ерліфта виникає направлена циркуляція культуральної рідини. В зовнішніх циркуляційних трубах також виникає циркуляція, з направленням потоків з гори до низу.

Недоліком апарату [1] являється те, що в ньому не можна культивувати мікроорганізми - деструктори вуглеводнів, які важко піддаються біоокисленню в результаті того, як ми вважаємо, що його конструкція не дозволяє створювати оптимальні умови масообміну між клітинами мікроорганізмів і вуглеводнями, і відповідно, досягати необхідної швидкості росту мікроорганізмів та адаптації культур до змін якісного складу компонентів вуглеводневих субстратів, необхідність в якій виникає

(13) C2

(11) 88997

(19) UA

при застосуванні біотехнологій охорони довкілля від забруднення.

Найближчим аналогом до винаходу за технічною суттю і результатом, що досягається, є апарат для вирощування аеробних мікроорганізмів (Авторское свидетельство СССР № 1497208 кл. С 12М 1/04, Опубл. 30.07.89, бюл. №28) [2].

Апарат містить ємність з технологічними патрубками для підводу повітря, поживного середовища і відводу готового продукту, розміщеними в ємності циркуляційним стаканом і аератором, систему зовнішньої рециркуляції культуральної рідини, що складається з трубопроводу відведення, спонукальника витрат і трубопроводу підведення з підключенням до останнього пристрою розбризкування культуральної рідини. Перед спонукальником витрат установлений гідроциклон, який підключений до трубопроводу відведення культуральної рідини і спонукальника витрат, а на трубопроводі підведення розміщений ежектор таким чином, що його сопло з'єднано з відвідним патрубком спонукальника витрат, а камера змішування підключена до патрубка відведення піни із гідроциклону.

Апарат працює таким чином.

Через технологічні патрубки ємність заповнюють поживним середовищем і посівною культурою мікроорганізмів. В патрубок аератора подають повітря, бульбашки якого забезпечують циркуляцію культуральної рідини та її перемішування. Після включення спонукальника витрат культуральна рідина надходить із ємності у нижню частину гідроциклону і звідти перекачується в ежектор. Одночасно через патрубок відведення піни, що утворюється в гідроциклоні, в камеру ежектора засмоктується парогазова суміш, що утворюється після руйнування піни. Складові культуральної рідини, що виділились в гідроциклоні, змішуються в ежекторі і направляються трубопроводом підведення в розбризкуючий пристрій. Культуральна рідина у вигляді крапель рівномірно розбризкується на шар піни, що утворюється в ємності, забезпечуючи її часткове руйнування, додаткове насичення культуральної рідини киснем повітря та її охолодження. Відпрацьоване повітря відводиться з апарату. В ємність через патрубки додатково вводять свіже повітря, яке також насичує киснем краплі, після чого відпрацьовувалась парогазова суміш, що утворюється, відводиться із ємності через газохід. Культуральну рідину як кінцевий продукт вивантажують через зливний патрубок. На цьому цикл напруцювання закінчується.

Відомий апарат [2] передбачає вирощування мікроорганізмів на багатих гомогенних органічних субстратах, які складаються переважно з розчинних вуглеводів, які легко засвоюються мікроорганізмами, наприклад, вирощування дріжджової культури на меласі. При цьому забезпечується високий вихід мікроорганізмів, що вирощуються.

Проте, як витікає із технічної суті відомого апарату [2] його конструкція не пристосована для культивування мікроорганізмів на субстратах, до складу яких входять компоненти, наприклад вуглеводні, які нерозчинні у воді та важко піддаються біологічному окисненню. Нами були проведені

досліди з моделювання процесу культивування у відомому апараті [2]. При цьому здійснювали вирощування нафтоокислюючих штамів бактерій родів *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* з виробничої бактеріальної асоціації, яка застосовується на станціях біологічної очистки нафтозабруднених (підсланьових) судових вод на станціях "СБО" проекту Д-120 Укррічфлоту. Зазначені штамми адаптовані до деструкції нафтопродуктів, виділених з підсланьових вод, склад яких включає суміш нафтопродуктів, що використовуються на судах річкового флоту. Культивування здійснювали на модельному середовищі, виготовленому на річковій воді з добавкою мінеральних елементів в складі, визначеному поживним середовищем Мюнца для культивування нафтоокислюючих мікроорганізмів. Як єдине джерело органічного вуглецю для життєдіяльності бактерій в склад поживного середовища вводили попередньо емульгований мазут флорський в концентрації 50мг/дм^3 . Після інокуляції культуральної рідини бактеріальною суспензією наведених культур вихідна концентрація мікроорганізмів у культуральному середовищі становила $\times 10^4\text{кл/дм}^3$. Було встановлено, що в процесі культивування при інтенсивному барботажі культуральної рідини повітрям спостерігалось видалення нафтопродукту у вигляді плівки на поверхні рідини. Аналогічний процес розділення фаз води і нафтопродуктів спостерігався також у гідроциклоні. З причин утворення плаваючої плівки з органічної складової субстрату зменшувалась поверхня контакту мікроорганізмів з вуглеводнями та масообмін у апараті і, відповідно, сповільнювалась швидкість росту бактеріальної культури. Концентрація мікроорганізмів у культуральному середовищі після 72 годин культивування досягла лише $\times 10^6\text{кл/дм}^3$ (див. таблицю, графа 3).

Слід також відмітити, що після вивантаження готового продукту в об'ємі ємності не залишається адаптованих до вуглеводного субстрату мікроорганізмів, в зв'язку з чим кожний наступний цикл культивування включає стадію адаптації мікроорганізмів.

Таким чином, основними недоліками відомого апарату для вирощування мікроорганізмів є малий вихід мікроорганізмів при культивуванні на вуглеводневих субстратах, що важко піддаються біоокисненню.

В основу винаходу поставлена задача розробити конструкцію апарату для культивування мікроорганізмів, в якому шляхом розміщення додаткового обладнання для одночасного введення вуглеводнів з різним ступенем біоокиснення та у різному агрегатному стані, використання насадки для іммобілізації мікроорганізмів, та відповідного просторового розміщення конструктивних елементів будуть забезпечені оптимальні умови адаптації та росту мікроорганізмів на вуглеводневих субстратах, що збільшить вихід мікроорганізмів при культивуванні на вуглеводневих субстратах, які важко піддаються біоокисненню.

Для вирішення поставленої задачі запропоновано апарат для культивування мікроорганізмів, що включає ємність з технологічними патрубками

та розміщеним в останній аератором, систему зовнішньої рециркуляції, що складається з трубопроводу відведення, спонукальника витрат і трубопроводу підведення та ежектора, розташованого на трубопроводі підведення, в якому, згідно з винаходом, апарат додатково обладнаний дозатором рідкого вуглеводневого субстрату, установленим перед спонукальником витрат, дозатором суміші парів вуглеводневого субстрату і повітря з патрубком підведення повітря та патрубком відведення суміші, який з'єднано з камерою змішування ежектора, останній з'єднано з аератором, система рециркуляції обладнана колоною, з'єднаною з ємністю, причому усередині колони і ємності розміщена насадка для іммобілізації мікроорганізмів; дозатор суміші парів вуглеводневого субстрату і повітря включає корпус з кришкою і висувний шибер для регулювання поверхні випаровування субстрату; в корпусі дозатора суміші парів вуглеводневого субстрату і повітря розміщений матеріал для просякнення вуглеводневим субстратом.

Обладнання апарата в запропонованому винаході двома дозаторами один із яких призначений для дозування рідкого вуглеводневого субстрату і установлений перед спонукальником витрат, а другий дозатор призначений для введення суміші парів вуглеводневого субстрату та повітря, який з'єднаний з камерою змішування ежектора, дозволяє одночасно вводити в апарат вуглеводні з різним ступенем окиснюваності та в різному агрегатному стані. При цьому крапельки емульгованого вуглеводневого субстрату, що важко піддається біодеструкції, насичуються парами вуглеводнів, які легко окиснюються. В результаті сумісного окиснення (кометаболізму) суміші вуглеводневих створюються оптимальні умови для адаптації та росту мікроорганізмів на вуглеводневих субстратах, що важко піддаються біодеструкції. З'єднання патрубка відведення суміші парів субстрату і повітря з камерою змішування ежектора, а ежектора з аератором дозволяє генерувати бульбашки повітря із сумішшю вуглеводнів різної ступені окиснюваності. При контактуванні таких бульбашок з поверхнею насадки, що розміщена у середині ємності, утворюється трьохфазна система: тверде тіло - суміш повітря та парів вуглеводнів - рідина, в якій інтенсивно протікають масообмінні процеси, що прискорює адаптацію і ріст мікроорганізмів.

Наявність в системі зовнішньої рециркуляції колони з розміщеною у середині насадкою збільшує загальну поверхню масообміну в апараті. Крім того заповнення ємності і колони насадкою дозволяє після вивантаження готового продукту залишати в об'ємі апарату іммобілізовані на насадці, адаптовані до вуглеводневого субстрату що важко піддається біоокисненню мікроорганізми, які використовуються при наступних циклах культивування, що також збільшує вихід адаптованих мікроорганізмів, що культивуються. Наявність з'єднувальних патрубків забезпечує відведення з циркуляційним потоком піни і плівки вуглеводнів, що утворюються в ємності, в колону зовнішньої рециркуляції, завдяки чому досягається ефективне

піногасіння в апараті та збільшується використання розчиненого в культуральній рідині кисню.

Таким чином, заявлена конструкція апарату є необхідною і достатньою для досягнення забезпеченого винаходом технічного результату: збільшення виходу мікроорганізмів при культивуванні на вуглеводневих субстратах, що важко піддаються біоокисненню, до $\times 10^9$ кл/мл (табл.граф.4).

Винахід пояснюється кресленням, де на фіг. зображений загальний вигляд апарату в розрізі.

Апарат для культивування мікроорганізмів включає ємність 1, з кришкою 2, патрубки 3, 4 для з'єднання з колоною 5 системи зовнішньої рециркуляції, а також патрубок 6 для вивантаження готового продукту. У середині ємності розміщений аератор 7 та насадка 8. Система зовнішньої рециркуляції, складається із колони 5 з патрубком для завантаження мінерального середовища, маточних культур мікроорганізмів та відводу відпрацьованого повітря і газів 9, патрубка 10 та трубопроводу 11 для відведення культуральної рідини, спонукальника витрат 12, трубопроводу підведення культуральної рідини 13 з розташованим на ньому ежектором 14, останній з'єднаний трубою 15 з аератором 7 ємності 1. Колона 5 заповнена насадкою 16 для іммобілізації мікроорганізмів. До системи зовнішньої рециркуляції підключені два дозатори вуглеводневого субстрату. Дозатор А рідкого вуглеводневого субстрату, що важко піддається біодеструкції, розташований на трубопроводі відведення 11 перед спонукальником витрат 12. Дозатор Б суміші повітря і парів вуглеводнів, що легко піддаються біодеструкції, містить корпус 17 з кришкою, висувний шибер 18 для регулювання поверхні випаровування субстрату, патрубок підведення повітря 19 та патрубок відведення суміші парів субстрату і повітря 20, останній з'єднаний з ежектором 14. На дні дозатора Б розташований матеріал 21 для просякнення вуглеводневим субстратом. На трубопроводі підведення 11 вмонтований пробовідбірник 22, через який періодично відбирають проби для визначення вмісту мікроорганізмів в культуральній рідині.

Для кількісного обліку мікроорганізмів використовують метод граничних розведень з наступним висівом на селективне середовище з відповідним вуглеводневим субстратом, за методикою (Антипчук А.Ф., Кіреєва І.Ю. Водна мікробіологія: Навчальний посібник.- Київ: Кодор, 2005. -с.212-213) [3].

Як насадку 8 в ємності 1 та насадку 16 в колоні 5 використовують насадку для мікробіологічної очистки води з волокнистого матеріалу (UA патент за заявкою №а200613384, заявл. 18.12.2006, рішення про видачу патенту від 18.06.2008.) [4].

Вирощування здійснюють на водопровідній воді з добавкою мінеральних елементів в складі, визначеному поживним середовищем Мюнца для нафтоокислюючих мікроорганізмів [3 с.78].

Як вуглеводневий субстрат, що важко піддається біоокисненню використовують нафту та нафтопродукти, зокрема, котельні палива, масла, (Топлива, смазочные материалы, технические жидкости. Ассортимент и применение:Справ.изд./К-М.: Химия, 1989.- с. 83-257) [5].

Як вуглеводневий субстрат, що легко піддається біодеструкції використовують н-алкани з довжиною вуглецевою цепочки C_9 - C_{16} , наприклад, декан $C_{10}H_{22}$ (Квасников Е.И., Ключникова Т.М. Микроорганизмы-деструкторы нефти в водных бассейнах.- Киев:Наук Думка, 1981, с.47) [6].

Як посівний матеріал при культивуванні на вуглеводневих субстратах використовують виділені з забрудненого нафтою та нафтопродуктами природного середовища та стічних вод бактерії родів *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*) [7 с.34-43].

Як матеріал для просякнення вуглеводневим субстратом в дозаторі Б використовують:

- Вуглецеві волокна Углен -9 ТУ 6- 06 И87- 81 [7];

- Нитки із поліефіру ГОСТ 24662-2002 [8];

Апарат працює наступним чином.

Ємність 1 і колонну 5 заповнюють через патрубок 9 поживним мінеральним середовищем та інокують культурою бактерій -деструкторів вуглеводнів. Дозатор А завантажують вуглеводнями, що важко піддаються біодеструкції, дозатор Б завантажують вуглеводнями, що легко піддаються біодеструкції. Шибром 18 виставляють поверхню випаровування субстрату, яка забезпечує вміст вуглеводнів в суміші, що надходить в ежектор - 0,1 - 0,2г/м³ повітря. Включають спонукальник витрат 12 і дозатор А, витрати вуглеводнів в якому встановлюють із розрахунку забезпечення початкової концентрації останніх 10-100г/м³ культуральної рідини. В процесі прокачки культуральної рідини по системі зовнішньої рециркуляції в камеру змішування ежектора 14 із дозатора Б всмоктується суміш повітря і парів субстрату, що легко окиснюється. В результаті на насадці 8 ємності 1 утворюється трьохфазна система: тверде тіло - суміш повітря і вуглеводнів - культуральна рідина, в якій активно протікають процеси масообміну. Із ємності 1 культуральна рідина з піною та плівкою, що утворились при барботажі надходить через патру-

бок 3 у колонну зовнішньої рециркуляції 5, з якої через патрубок 9 відводяться відпрацьоване повітря і газу. В колоні, у т.ч. на насадці 16 відбувається руйнування піни, а також ріст мікроорганізмів в іммобілізованому стані. Періодично провідбірником 22 відбирають проби культуральної рідини і контролюють в ній вміст мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів. При досягненні вмісту мікроорганізмів в культуральній рідині на рівні $\times 10^8$ - 10^9 кл/мл цикл завершують. Культуральну рідину зливають з ємності 1 через патрубок 6 для використання.

Приклад виконання за винаходом.

Ємність 1 і колонну 5 через патрубок 9 заповнюють до рівня патрубка 3 поживним мінеральним середовищем в складі: вода водопровідна - 1дм³; амоній азотнокислий (NH_4NO_3) - 1,0г/дм³; однозаміщений фосфорнокислий калій (KH_2PO_4) - 0,5мг/дм³; дво-заміщений фосфорнокислий калій (K_2HPO_4) - 0,5мг/дм³; сульфат магнію ($MgSO_4 \times 7H_2O$) - 0,5мг/дм³. Інокуляцію здійснюють асоціацію бактерій родів *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* виділених на станції очистки підсланьових судових вод взятих із розрахунку забезпечення у культуральній рідині концентрації $\times 10^4$ кл/мл мінерального середовища. Дозатор А завантажують мазутом флотським Ф5 (ГОСТ 10585-75) і виставляють витрати із розрахунку забезпечення його початкової концентрації у культуральній рідині 50мг/м³. Дозатор Б завантажують н-деканом і шибром виставляють витрати із розрахунку 0,1г/м³ повітряної суміші. Включають насос системи рециркуляції з інтенсивністю рециркуляції культуральної рідини - 3,6м³/год.

В наведеному прикладі після 72 годин культивування вихід мікроорганізмів становив $\times 10^9$ кл/мл.

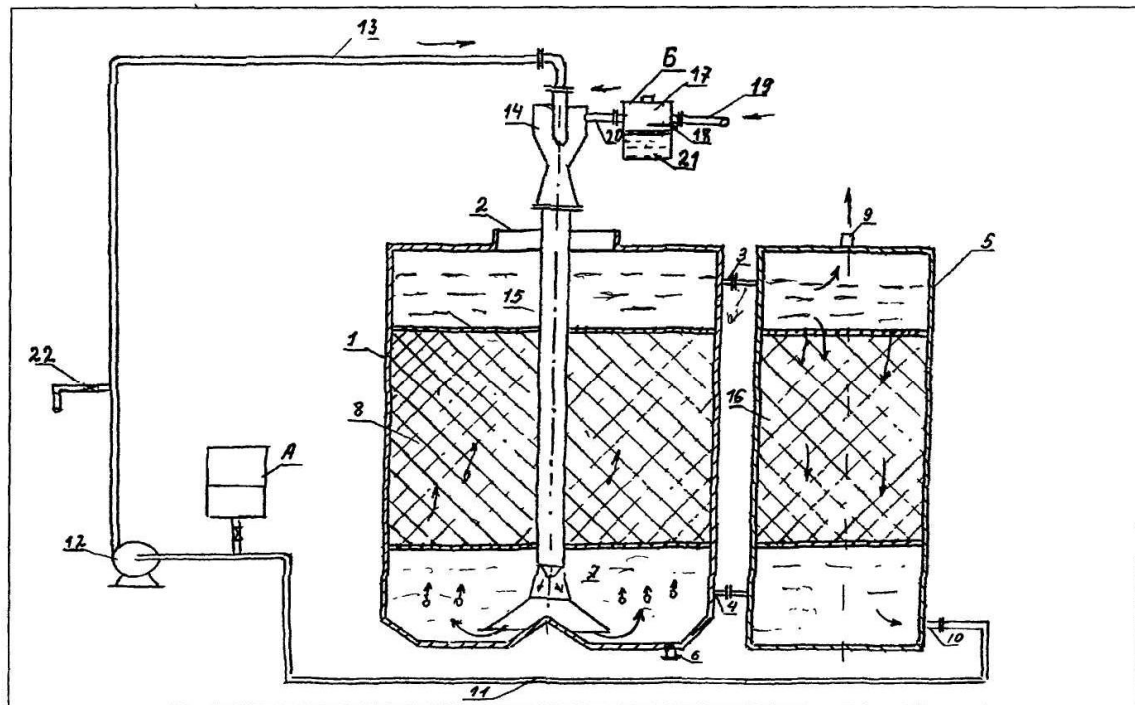
Ефективність запропонованого апарату для культивування мікроорганізмів, в порівнянні із відомим апаратом [2], представлена в таблиці.

Таблиця

Показники	Розмірність	Апарат [2]	Заявлений апарат
1	2	3	4
Термін культивування	годин	72	72
Чисельність мікроорганізмів	кл/мл	$\times 10^6$	$\times 10^9$

Як видно із даних таблиці запропонований апарат при культивуванні з використанням як єдиного джерела вуглецю мазута флотського, що важко піддається біоокисненню, підвищує вихід

мікроорганізмів на три порядки, а також забезпечує утримання в об'ємі апарату культур, адаптованих до якісного складу вуглеводневого субстрату.



Фиг.