

(19)



(10) **LT 4792 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4792**

(51) Int. Cl. ⁷: **C12N 1/20**
B09C 1/10
C02F 3/34

(21) Paraiškos numeris: **2000 058**

(22) Paraiškos padavimo data: **2000 07 04**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2001 01 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2001 05 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Antanas DIDŽIAPETRIS, LT
Karolis JANKEVIČIUS, LT
Vidmantas JANUŠKA, LT
Juozas KRIŠČIŪNAS, LT
Rapolas LIUŽINAS, LT
Albinas LUGAUSKAS, LT
Jūratė REPEČKIENĖ, LT
Algimantas PAŠKEVIČIUS, LT

(73) Patent savininkas:

Viešoji įmonė "Grunto valymo technologijos", Antakalnio g. 42, 2040 Vilnius, LT
Botanikos institutas, Žaliųjų ežerų g. 49, 2021 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Genė Ona SRUOGIENĖ, UAB "TARPINĖ", A.P.Kavoliuko g. 24-152, 2050 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, skaidantis naftą ir naftos produktus

(57) Referatas:

Išradimas priklauso mikrobiologijos, biotechnologijos bei aplinkos apsaugos sritims. Naujas štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, išskirtas iš mazutu užteršto naftos bazės dirvožemio (deponuotas Botanikos

LT 4792 B

LT 4792 B

Instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje (LT), kolekcijos numeris IBL: B-57), naftą ir naftos produktus skaidantis mikroorganizmas, išskiriantis į terpę ekstraceliulinį emulguojantį junginį ir neantagonistiškas dirvožemio mikroorganizmams.

Išradimas priklauso mikrobiologijos, biotechnologijos bei aplinkos apsaugos sritims ir gali būti panaudotas vandens, dirvožemio bei grunto, užterštų naftos produktais, ypač sunkiosiomis jos frakcijomis, biologiniam valymui suintensyvinti.

Žinomas US patente Nr. 3 813 316 aprašytas štamas *Pseudomonas aeruginosa* PAO, kuris turi plazmides CAM, OCT, NAH ir SAL su angliavandenilių utilizacijos genais ir yra panaudotas naftos produktų skaidymui.

Šio štamo trūkumas – per daug lėtas naftos degradacijos procesas.

Žinomas pagal aut. l. SU 1 805 097, C02F 3/34, štamas *Rhodococcus erythropolis* No 2 BKM AC-1339D, skaidantis naftą dirvoje.

Šio štamo trūkumas yra lėtas naftos skaidymas. Skystoje mitybinėje terpėje su 1 % naftos maksimaliai ją biodegraduoja iki 78 %, o grunte per 40 parų – iki 76 %.

Žinomas pagal patentą RU 2 019 527, C02F 3/34, E02B 15/04, C09K 17/00, štamas *Rhodococcus erythropolis* E-15 skaido naftą ir jos produktus tundros dirvose esant žemoms temperatūroms (8 – 10 °C).

Šio štamo ypatybė – geriausiai tinka naudoti geografiniuose rajonuose su šaltu klimatu.

Žinomas pagal patentą RU 2 053 296, C12N 1/20, C02F 3/34, štamas *Mycobacterium flavescens* EX-91, naudojamas vandens ir dirvos valymui nuo naftos ir naftos produktų.

Šio štamo trūkumas – lėtas skaidymas ir aukšta funkcionavimo temperatūra. Esant 28°C temperatūrai per 7 paras jis suskaido 74% naftos ir 55% mazuto.

Žinomas azotfiksuojuantis štamas *Azotobacter vinelandii* 21, aprašytas patento LR 3111, C12N 15/00, aprašyme, išskirtas iš užteršto sunkiosiomis naftos frakcijomis vandens po

tanklaivio avarijos ir naudojamas gėlo ir sūraus vandens bei dirvos valymui nuo naftos ir jos produktų.

Šio štamo trūkumas – lėtas naftos ir sunkiųjų jos frakcijų skaidymas ir aukšta 30°C optimali vystymosi temperatūra. Per 21 parą šis štamas suskaidė 75,6 % parafininės naftos ir 80,2 % aromatinės naftos.

Artimiausias siūlomam štamui pagal savo sisteminę padėtį ir biodegradacines savybes štamas *Pseudomonas putida* 36, skaidantis naftą ir jos produktus vandenyje ir dirvožemyje (žiūrėti a. l. SU 1 076 446, C12N 15/00, C02F 3/34, C12R 1/40).

Šio štamo trūkumas – lėtas naftos skaidymas ir aukštoje 28 - 40 °C temperatūroje. Per 30 parų suskaido 74,5 % parafininės naftos ir 68 % aromatinės. Lėtai skaido ir sunkiausius aromatinius naftos produktus – per 21 parą suskaido iki 57,2 %.

Išradimo tikslas – pagreitinti sunkiųjų naftos frakcijų degradavimą žemesnėse temperatūrose (20 – 25 °C), naudojant atrinktą *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 štamą.

Siūlomas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 štamas, išskirtas iš mazutu užteršto naftos bazės dirvožemio. Štamas deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje, kolekcinis numeris IBL: B-57.

Štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 išskirtas panaudojant klasikinę mikrobiologinę grynų kultūrų išskyrimo metodiką (P. Gerhardt (ed.), 1981: Manual of Methods for General Bacteriology. – Washington). Naftuoto dirvožemio mėginys įberiamas į mineralinę terpę su skaidomu substratu ir kultivuojamas 20°C temperatūroje. Iš gautos mišrios kultūros išskiriamos grynos kultūros. Iš daugelio tokių izoliatų atrenkamas štamas, turintis didžiausią aktyvumą skaidant naftos produktus.

Atrinkta aktyviausia kultūra vadovaujantis 9-to leidimo Bergey apibūdintoju (R. G. F. Murray et. al. (eds. board), 1984-1989: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed., vol I-IV – Williams and Wilkins Co., Baltimore) apibūdinta kaip *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895, 29^{AL}, štamo numeris – IGN 57.

Siūlomas mikroorganizmo štamas pasižymi šiomis savybėmis:

Morfologinės savybės. Ląstelės plonų lazdelių formos $0,5 \times 2-3 \mu\text{m}$ dydžio, sudaro binarinius junginius. Gramneigiamos. Judrios – juda kelių poliarinių žiuželių pagalba. Ląstelių viduje nekaupia poli- β -oksibutirato. Nesudaro endosporų, neturi kapsulių.

Kultūriniai požymiai. Ant mėsos ir peptono agarų (MPA) užauga per 24 val, sudarydamas apvalias taisyklingas, lygaus krašto, skaidrias, iškilo profilio, blizgančias kolonijas 1-3 mm skersmens. Sintetina geltonai žalią fluorescuojantį intraląstelinį pigmentą, kuris lengvai pastebimas praeinančioje šviesoje. Auginant mėsos ir peptono buljone (MPB) atsiranda homogeniškas drumstumas, plona plėvelė ir mažas kiekis nuosėdų. Ant bulvės užauga bespalvis štrichas su matiniu paviršiumi. Ant agarizuotos mineralinės terpės su nafta pradeda augti per 24 val. sudarydamos smulkias kolonijas. Ant terpės su mazutu augimas pasirodo po 72 val. Aplink kolonijas tiek su nafta, tiek su mazutu sudaro lipofobines substrato atstūmimo zonas.

Fiziologinės savybės. Griežtas aerobas, katalazės ir oksidazės reakcijos teigiamos. Tipiškas mezofilas, gerai auga $4-37^{\circ}\text{C}$ temperatūrų intervale, optimali temperatūra $20-28^{\circ}\text{C}$. 42°C temperatūroje neauga. Auga ant Ešbio terpės. Gerai įsisavina mineralinius azoto šaltinius, nitratus redukuoja iki azoto. Skystina želatiną, krakmolo nehidrolizuoja, kazeino proteolizė silpna. Sudaro sieros vandenilį ir amoniaką. Naudoja gliukozę, ksilozę, sacharozę bei galaktozę, sudarydamas rūgštis, su maltoze rūgščių nesudaro, gerai auga su sorbitu ir etanolium. Auga MPB su 0,6 % NaCl. Neįsisavina sviesto rūgšties ir triptofano. Auga ant mineralinės terpės su angliavandeniliais: heksanu, dekanu, heksadekanu, oktadekanu, ksilolu, toluolu, n-ftalinu, dekalinu, parafinu. Mineralinėje terpėje su angliavandenilinais substratais sintetina ekstraceliulinę emulguojantį junginį, padedantį lengviau įsisavinti hidrofobinį substratą.

Siūlomo štamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 biodestrukcinis pajėgumas buvo tirtas auginant skystoje mineralinėje terpėje su naftalinu, nafta ir mazutu kaip vieninteliais anglies šaltiniais. Buvo panaudota mineralinė terpė tokios sudėties (g/l): NH_4NO_3 – 1,5; KH_2PO_4 – 1; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001. pH 7,2-7,4. Į terpę substrato dėta 1% Kultivuota ant kratyklės 20 parų esant $20-25^{\circ}\text{C}$ temperatūroms. Likučiai matuoti 7-ą ir 20-ą kultivavimo parą.

Rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė

Štamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 angliavandenilinių substratų suskaidymas

Substratas	Išmatuotas substrato kiekis bandymo pradžioje, mg	Substrato likutis po kultivavimo:			
		7 parų		20 parų	
		likutis, mg	suskaidyta, %	likutis, mg	Suskaidyta, %
Naftalinas	647	78,0	87,9	0,4	99,9
Nafta	825	132,0	84,0	1,8	99,8
Mazutas	715	281	60,7		

Siūlomas štamas per 7 paras laboratorinėse sąlygose suskaido (lyginant su išmatuotu substrato kiekiu bandymo pradžioje) 87,9 % naftalino, 84,0 % naftos ir 60,7 % mazuto. 20-ą parą naftalinas suskaidytas iki 99,9 %, o nafta – 99,8 %.

Kultivuojant vienoje terpėje siūlomą štamą kartu su grybu štamu *Trichoderma harzianum* VNB-16 po 7 parų mazuto suskaidymas siekė 71,6 %. Tuo tarpu vienas grybas suskaidė tik 15,3 % mazuto.

Atliekant antagonizmo tyrimus nustatyta, kad siūlomas štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 nėra antagonistiškas plačiausiai dirvoje paplitusioms grybų ir mielių rūšims, taip pat ir gramteigiamoms bakterijoms.

Siūlomo štamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 ir žinomo štamo *Pseudomonas putida* 36 biodegradacinių savybių palyginimas pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė

Štamų *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 ir žinomo *Pseudomonas putida* 36 biodegradacinių savybių palyginimas

	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IGN 57	<i>Pseudomonas putida</i> 36
Naftos suskaidymas	84,0 %	68,4-74,5 %
Biodegradacijos trukmė	7 paros	30 parų
Temperatūra	20 – 25 °C	30 °C

Siūlomas štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 palyginus su štamu *Pseudomonas putida* 36 pasižymi tuo, kad greičiau skaido naftą bei naftos sunkiąsias frakcijas žemesnėse

temperatūrose – 20 – 25 °C. Be to, esant terpėje hidrofobiniam angliavandeniliniam substratui, išskiria į aplinką ekstraceliulinę emulguojantį junginį, pagreitinantį skaidymo procesą. Taip pat nėra antagonistiškas plačiausiai dirvoje paplitusioms grybų ir mielių rūšims ir gramteigiamoms bakterijoms. Minėti požymiai leidžia aprašytąjį štamą panaudoti dirvožemio ir grunto biologinio valymo nuo naftos ir jos produktų pagreitinimui.

Štamo panaudojimas iliustruojamas pavyzdžiais.

1 pavyzdys

Ant dirvos išsiplieskė nafta, užterštas plotas 200 m², teršalų kiekis 1 m² yra 5 kg. Bendras teršalų kiekis 1 tona. Paruošiamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 suspensiją: 40 l fermentatoriuje išaugintos biomasės praskiedžiame 2 m³ druskų ir kt. bakterijai reikalingų priedų tirpale. Gautą suspensiją išpurškiame ant užteršto dirvožemio sluoksnio jį perkasant ir išpurenant. Valymo proceso eigoje dirvos sluoksnio purenimą atliekame periodiškai 1 kartą per savaitę.

Rezultatas: 1000 kg naftos, užteršiančios gruntą (500 mg naftos/cm² arba 1 tona naftos/200 m²) ir valant šį naftingą gruntą paskleidus jį 0,5 m sluoksniu, naudojant *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, suardoma 97 % naftos per parą.

2 pavyzdys

Naftos produktais užteršto dirvožemio valymas aikštelėje. Valymo aikštelėje yra 100 tonų užteršto dirvožemio. Naftos produktų 20 mg/g žemės Dirvožemis sumaišomas su trąšomis, turinčiomis N ir P bei kitų priedų, reikalingų bakterijų dauginimuisi. Patikrinamas mišinio pH ir, jei jis mažesnis už 4, mišinį reikia kalkinti. Paskui dirvožemis paskleidžiamas 0,5 m storio sluoksniu (jei teršalų daugiau, sluoksnis turi būti plonesnis). Paruošiamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 suspensiją: 100 l fermentatoriuje išaugintos biomasės praskiedžiame 10 m³ druskų ir kt. bakterijai reikalingų priedų tirpale. Gautą suspensiją išpurškiame ant paruošto dirvožemio sluoksnio jį perkasant.

Rezultatas: 2000 kg naftos, teršiančios gruntą (20 mg naftos/1 g grunto), valant šį naftingą gruntą paskleidus jį 0,5 m sluoksniu, naudojant *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, suardoma 98 % naftos per parą.

3 pavyzdys

Naftos produktais užteršto dirvožemio valymas kompostavimo būdu. Vasarą aikštelėje (žiema šildomoje patalpoje iki 20 °C) yra 100 tonų užteršto dirvožemio. Naftos produktų 20 mg/g žemės. Dirvožemis sumaišomas su trąšomis, turinčiomis N ir P bei kitų priedų, reikalingų bakterijų dauginimuisi. Į mišinį pridedama susmulkintų šiaudų. Patikrinamas mišinio pH ir, jei jis mažesnis už 4, mišinį reikia kalkinti. Paskui dirvožemis supilamas suformuojant kaupą. Jei teršalų daug ir žemės kiekis didelis, kaupe reikia įrengti oro prapūtimo sistemą (aktyvus būdas) arba išvedžioti vamzdelių sistemą natūraliai ventiliacijai paspartinti (pasyvus būdas). Paruošiamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 suspensiją: 20 l fermentatoriuje išaugintos biomasės praskiedžiame 1 m³ druskų ir kt. bakterijai reikalingų priedų tirpale. Gautą suspensiją išpurškiame ant paruošto dirvožemio kaupo, kuo giliau jį perkasant.

Rezultatas: 2000 kg naftos, teršiančios gruntą (20 mg naftos/1 g grunto), valant šį naftingą gruntą grunto kaupo sistemoje, naudojant *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, suardoma 97 % naftos per 36 paras.

4 pavyzdys

Naftos produktais užteršto vandens telkinio valymas. Užterštas plotas 100 m², teršalų kiekis 0,2 tonos. Užterštą plotą reikia izoliuoti (panaudojant spec. priemones) nuo platesnio pasiskleidimo. Paruošiamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 suspensiją: 10 l fermentatoriuje išaugintos biomasės praskiedžiame 0,5 m³ druskų ir kt. bakterijai reikalingų priedų tirpale. Paruoštą suspensiją išpurškiame ant vandens paviršiaus 5 l į 1 m² paviršiaus.

Rezultatas: kai vandens paviršius užterštas nafta (200 mg naftos/1 cm² arba 200 kg/100 m²) ir valomas naudojant *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, suardoma 99 % naftos per parą.

Štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 naudojimas biologiniam dirvožemio, vandens ir grunto valymui nuo naftos ir jos produktų. Jis gali būti panaudojamas biologiniam valymui avarinio naftos produktų išsipylimo į dirvą atveju, naftos produktams patekus į gėlus vandens telkinius ir taip pat gali būti panaudotas užteršto naftos produktais grunto valymui aikštelėse kompostavimo būdu.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 (deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje (LT), kolekcijos numeris IBL: B-57) –naftą ir naftos produktus skaidanti bakterija, išskirianti į terpę ekstraceliulinę emulguojantį junginį ir neantagonistiška dirvožemio mikroorganizmams.
2. Štamas *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, skirtas biologiniam dirvožemio, vandens ir grunto valymui nuo naftos ir jos produktų.
3. Štamo *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 pagal 1 punktą gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naftuoto dirvožemio mėginį įberia į mineralinę terpę su skaidomu substratu, kultivuoja 20 - 25°C temperatūroje, iš gautos kultūros išskiria grynas kultūras, iš daugelio tokių izoliatų atrenka kultūrą, kuri aktyviausiai skaido naftos produktus.