

(11) Patento numeris: **4522**

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 1/02**
C12S 1/00

(21) Paraiškos numeris: **98-146**

(22) Paraiškos padavimo data: **1998 10 16**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 05 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1999 07 26**

(72) Išradėjas:

Vidmantas Januška, LT
Albinas Lugauskas, LT

(73) Patento savininkas:

Botanikos institutas, Žaliųjų ežerų g. 49, 2021 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Virgina Adolfina Draugelienė, 8, UAB "TARPINĖ",
A.P.Kavoliuko g. 24-152, 2050 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

IBL : B-84, Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijos kolekcija,
LT

(54) Pavadinimas:

Naftą ir naftos produktus skaidantis mikroorganizmas *Arthrobacter*
***globiformis* MD18**

(57) Referatas:

Išradimas priklauso mikrobiologijos bei aplinkos apsaugos sritims. Naujas mikroorganizmas *Arthrobacter globiformis* MD18 (deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje, kolekcijos numeris B-84), išskirtas iš mazutu užteršto dirvožemio, efektyviai skaldo naftą ir naftos junginius. Šis mikroorganizmas naudojamas biologiniam dirvos ir vandens valymui nuo naftos ir jos produktų teršalų.

Išradimas priklauso mikrobiologijos bei aplinkos apsaugos sritims, būtent, naftą ir naftos produktus skaidantiems mikroorganizmams. Išradimas gali būti panaudotas vandens bei įvairių dirvožemių, užterštų naftos produktais, ypač sunkiosiomis jo frakcijomis, biologiniam valymui.

Žinomas JAV patente Nr. 3813316 aprašytas *Pseudomonas aeruginosa* PAO kamienas, kuris turi plazmides CAM, OCT, NAH ir SAL su angliavandenilių utilizacijos genais ir naudojamas naftos produktų skaidymui.

Šio kamieno trūkumas - labai lėtas naftos degradacijos procesas.

Žinomas išradimo aprašyme (pagal buv. TSRS a.l. Nr.612958) aprašytas *Pseudomonas aeruginosa* kamienas, turintis plazmides OCT⁺, CAM⁺ ir NAH⁺, naudojamas biologiniam vandens, užteršto naftos produktais, valymui.

Šio kamieno trūkumas yra siauras jo veikimo spektras.

Žinomas išradimo aprašyme (pagal buv. TSRS a.l. Nr.1076446) aprašytas *Pseudomonas putida* 36 kamienas, skaidantis naftą ir jos produktus vandenyje ir dirvožemyje. Šis kamienas išskirtas Tiumenės srityje iš Belozersko naftos radimvietės 13100 gręžinio.

Šio kamieno trūkumas - lėtas aromatinių junginių skaidymas. Per 30 parų suskaido 74,5% parafininės naftos, o aromatinės - 68 % nuo pradinio kiekio.

Artimiausias savo veikimu siūlomam kamienui yra kamienas, aprašytas LR patente Nr.3111 B, *Azotobacter vinelandii* 21, išskirtas iš užteršto dirvožemio sunkiosiomis naftos frakcijomis po tanklaivio avarijos ir siūlomas naudoti gėlo ir sūraus vandens bei

dirvos valymui nuo naftos ir jos produktų teršalų. Kamienas deponuotas UAB "Biocentras" mikroorganizmų muziejaus kolekcijoje, kolekcinis numeris BC-21.

Šio kamieno trūkumas - gana lėtas naftos ir sunkiųjų jos frakcijų skaidymas. Per 21 parą šis kamienas suskaidė iki 75,6% parafininės naftos ir iki 80,2% aromatinės naftos nuo pradinio kiekio.

Išradimo tikslas - pagreitinti sunkiųjų naftos frakcijų skaidymą.

Siūlomas *Arthrobacter globiformis* MD18 kamienas, išskirtas iš mazutu užteršto Vilniaus naftos bazės dirvožemio. Kamienas deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje, kolekcinis numeris B-84.

Arthrobacter globiformis MD18 kamienas gautas panaudojant mikrobiologinę kultūrų skyrimo metodiką, būtent užterštas mazutu dirvožemio mėginys buvo įbertas į Čapeko terpę su skaidomu substratu (mazutu) ir aeruojant kultivuojamas 4-6 paras apie 30°C temperatūroje, gauta kultūra praskiedimo metodu buvo išsėta ant standžios Čapeko terpės su mazutu, kaip vienintelės anglies ir energijos šaltinio, po to vėl kultivuojama 5 - 6 paras apie 30°C temperatūroje. Užaugusios izoliuotos bakterijų kolonijos išsėjamos į mėgintuvėlius ant įžambaus Čapeko terpės agaro su mazutu. Po to buvo lyginamas išskirtų kultūrų aktyvumas ir išrenkamas aktyviausiai skaidantis naftos produktus kamienas. Atrinktas aktyviausias mikroorganizmo kamienas vadovaujantis Bergey'o apibūdintoju (Murray R.G.F. et al (eds. board), 1984-1989: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology 9th ed, The Williams and Wilkins Co., Baltimore) apibūdintas kaip *Arthrobacter globiformis* MD18.

Siūlomas mikroorganizmo kamienas pasižymi šiomis savybėmis:

Morfologinės savybės. Ląstelės jaunoje kultūroje yra 1,0 - 1,2 x 2,3 - 2,9 µm dydžio, o senose kultūrose jos virsta kokais, kurie sudaro grandinėles. Morfologiniai formos kitimai priklauso nuo amžiaus ir kultivavimo sąlygų. Nesudaro endosporų, neturi kapsulių bei neturi žiuželių. Gramteigiamos.

Kultūriniai požymiai. Ant mėsos peptono agaro (MPA) užauga per 48 val. ir yra balsvos, netaisyklingos, nelygaus krašto, iškilo profilio, blizgančios kolonijos 2-3 mm skersmens. Ant sintetinės terpės su nafta užauga per 24 val. sudarydamos smulkias baltas kolonijas. Mėsos peptono buljone (MPB) plėvelės nesudaro, duoda drumstumą ir nuosėdas.

Fiziologinės savybės. Aerobinės. Katalazės reakcija yra teigiama, o oksidazės - neigiama. Tipiški mezofilai, auga nuo 4° iki 40°C, optimali temperatūra 28°-30° C. Krakmolo nehidrolizuoja, vykdo denitrifikaciją, želatinos neskystina, naudoja gliukozę, fruktozę, sacharozę bei manitą. Auga ant Ešbio terpės.

Auga ant sintetinės terpės su angliavandeniliais: heksanu, dekanu, heksadekanu, oktadekanu, antracenu, toluolenu, ksilolenu, naftalenu, dekalinu, parafinu bei asfaltenais.

Siūlomo *Arthrobacter globiformis* MD18 ir žinomo *Azotobacter vinelandii* 21 kamienų naftą degraduojančių savybių palyginimas.

Požymiai	<i>Arthrobacter globiformis</i> MD 18	<i>Azotobacter vinelandii</i> 21
Naftos degradacija (%)		
aromatinės	82,4	80,2
parafininės	77,2	75,6
Degradacijos trukmė	18 parų	21 para
Naftos sunkiųjų frakcijų skaidymas (%)	75,6	72,5
Degradacijos trukmė	20 parų	21 para
Naftos skaidymas vandenyje (%)	78,4	77,4
Angliavandenilių degradacija:		
antracenas	74,9	72,6
dekalinas	44,5	44,4
oktadekanas	42,7	36,7
asfaltenai	29,7	27,5

Aukščiau pateiktų duomenų apibendrinimas rodo, kad siūlomas kamienas per 18 parų parafininę naftą suskaidė iki 77,2%, aromatinę iki 82,4%, o *Azotobacter vinelandii* 21 per 21 parą suskaidė atitinkamai iki 75,7% ir 80,2% nuo pradinio kiekio. Per 20 parų *Arthrobacter globiformis* MD18 suskaidė naftos sunkiųjų frakcijų iki 75,6%, o *Azotobacter vinelandii* 21- 72,5 % nuo pradinio kiekio. Vandenyje *Arthrobacter globiformis* MD18 suskaidė 78,4% naftos, o *Azotobacter vinelandii* 21 - 77,4% nuo pradinio kiekio. *Arthrobacter globiformis* MD18 suskaidė 74,9% antraceno, 44,5% dekalino, 42,7% oktadekano ir 29,7% asfaltenų, tuo tarpu *Azotobacter vinelandii* 21 - 72,6%, 44,4%, 36,7%, 27,5% atitinkamai nuo pradinio kiekio.

Arthrobacter globiformis MD18 kamieno panaudojimo pavyzdžiai.

1 pavyzdys.

Dirvos, ant kurios išsipylė nafta, vietinis valymas. Nafta užteršto dirvožemio plotas 200 m², teršalų kiekis 2 kg/1 m². Bendras teršalų kiekis 400 kg. Dirvos valymui paruošia *Arthrobacter globiformis* MD18 suspensiją: fermentatoriuje Čapeko terpėje išaugina 100 l kultūrinio skysčio (8-10 g/l sausos masės). Išaugintą kultūrinį skystį praskiedžia 1x10³ l mitybai reikalingų druskų vandeniniu tirpalu, pavyzdžiui, NaNO₃ - 4g/l, K₂HPO₄ - 0,6 g/l, Na₂HPO₄ - 0,6 g/l. Gautą suspensiją išpurškia ant užteršto dirvožemio paviršiaus, po to dirvožemį perkasa ir išpurena. Valymo proceso eigoje dirvos sluoksnį purena periodiškai 1 kartą per savaitę. Natūraliomis sąlygomis, esant oro temperatūrai 15 - 22° C, dirvos išsivalymo procesas trunka 2 - 3 mėnesius. Dirvožemio išsivalymo kokybę nustato specializuotoje ekologinės tarnybos laboratorijoje atliekant laboratorinę dirvos mėginio analizę pagal likutinę angliavandenilių koncentraciją.

2 pavyzdys.

Naftos produktais užteršto dirvožemio valymas aikštelėje. Užteršto dirvožemio kiekis aikštelėje - 100 tonų. Naftos produktų 200 mg/g, bendras teršalų kiekis 20 tonų. Užterštą dirvožemį sumaišo su trąšomis, turinčiomis N ir P ir/arba kitų priedų, reikalingų minėto mikroorganizmo dauginimuisi. Patikrina mišinio pH, ir jam esant mažesniau už 4, mišinį kalkina. Po to dirvožemį paskleidžia aikštelėje apie 0,5 m

storio sluoksniu (esant teršalų didesniai kiekiui, sluoksnis turi būti plonesnis). Paruošia *Arthrobacter globiformis* MD18 suspensiją: fermentatoriuje Čapeko terpėje išaugina 100 l kultūrinio skysčio (8-10 g/l sausos masės). Išaugintą kultūrinį skystį praskiedžia 1×10^3 l mikroorganizmų mitybai reikalingų druskų vandeniniu tirpalu, pavyzdžiui, NaNO_3 - 4g/l, K_2HPO_4 - 0,6 g/l, Na_2HPO_4 - 0,6 g/l. Gautą suspensiją išpurškia ant paruošto dirvožemio sluoksnio, kurį po to perkasa. Natūraliomis sąlygomis, esant oro temperatūrai 15 - 22° C, dirvos išsivalymo procesas trunka 2 - 3 mėnesius. Dirvožemio išsivalymo kokybę nustato specializuotoje ekologinės tarnybos laboratorijoje atliekant laboratorinę dirvos mėginio analizę pagal likutinę angliavandenilių koncentraciją.

3 pavyzdys.

Naftos produktais užteršto dirvožemio valymas kompostavimo būdu. Vasarą aikštelėje (arba šildomoje patalpoje iki 20°C žiemą) yra 100 tonų užteršto dirvožemio. Naftos produktų 200 mg/g žemės, bendras teršalų kiekis 20 tonų. Į užterštą dirvožemį deda trąšų, turinčių N ir P ir/arba kitų medžiagų, reikalingų minėto mikroorganizmo dauginimuisi ir prideda susmulkintų šiaudų. Po to dirvožemį sumaišo ir patikrina mišinio pH. Esant mišinio pH mažesniai už 4, mišinį kalkina. Po to supila dirvožemio kaupą. Jeigu teršalų daug ir žemės kiekis didelis, kaupę įrengia oro prapūtimo sistemą (aktyvus būdas) arba išvedžioja vamzdelių sistemą natūraliai ventiliacijai paspartinti (pasyvus būdas). Paruošia *Arthrobacter globiformis* MD18 suspensiją: fermentatoriuje Čapeko terpėje išaugina 100 l kultūrinio skysčio (8-10 g/l sausos masės). Išaugintą kultūrinį skystį praskiedžia 1×10^3 l mikroorganizmų mitybai reikalingų druskų vandeniniu tirpalu, pavyzdžiui, NaNO_3 - 4g/l, K_2HPO_4 - 0,6 g/l, Na_2HPO_4 - 0,6 g/l. Gautą suspensiją išpurškia ant paruošto dirvožemio kaupą ir kuo giliau dirvožemį perkasa. Natūraliomis sąlygomis, esant oro temperatūrai 15 - 20° C, dirvožemio išsivalymo procesas trunka 1-2 mėnesius. Dirvožemio išsivalymo kokybę nustatoma specializuotoje ekologinės tarnybos laboratorijoje atliekant laboratorinę dirvožemio mėginio analizę pagal likutinę angliavandenilių koncentraciją.

4 pavyzdys.

Naftos produktais užteršto vandens telkinio valymas. Užterštas vandens plotas

100 m², teršalų kiekis - 0,2 tonos. Valomą plotą izoliuoja (panaudojant spec. priemones) nuo platesnio užteršto vandens pasiskleidimo. Paruošia *Arthrobacter globiformis* MD18 suspensiją: fermentatoriuje Čapeko terpėje išaugina 100 l kultūrinio skysčio (8-10 g/l sausos masės). Išaugintą kultūrinį skystį praskiedžia 1x10³ l mikroorganizmų mitybai reikalingų druskų vandeniniu tirpalu, pavyzdžiui, NaNO₃ - 4g/l, K₂HPO₄ - 0,6 g/l, Na₂HPO₄ - 0,6 g/l. Paruoštą suspensiją išpurškia ant vandens paviršiaus 5 l/m². Natūraliomis sąlygomis, esant oro temperatūrai 15 - 22° C, vandens išsivalymo procesas trunka 2-4 savaites. Vandens išsivalymo kokybė nustatoma specializuotoje ekologinės tarnybos laboratorijoje atliekant laboratorinę vandens mėginio analizę pagal likutinę angliavandenilių koncentraciją

Pasiūlytas *Arthrobacter globiformis* MD18 kamienas palyginus su *Azotobacter vinelandii* 21 pasižymi tuo, kad greičiau skaido aromatinę naftą bei naftos sunkiąsias frakcijas, geriau įsisavina asfaltenus, aromatinius (antracenas), ciklinius (dekalinas) angliavandenius ir geriau skaido naftą vandenyje. Minėti požymiai leidžia pagreitinti valymo procesą panaudojant aprašytąjį kamieną dirvožemio ar vandens biologiniam valymui nuo naftos ir jos produktų teršalų.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Mikroorganizmo kamienas *Arthrobacter globiformis* MD18 (deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje (LT), kolekcijos numeris B-84) - naftą ir naftos junginius skaidantis mikroorganizmas.
2. Mikroorganizmo kamienas *Arthrobacter globiformis* MD18, skirtas panaudoti užterštą naftą ir naftos produktais dirvožemio arba vandens biologiniam valymui.
3. Mikroorganizmo kamieno *Arthrobacter globiformis* MD18 gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad mazutu užterštą dirvožemio mėginį įberia į Čapeko terpę su skaidomu substratu (mazutu) ir aeruojant kultivuoja 4 - 6 paras apie 30°C temperatūroje, gautą kultūrą praskiedimo metodu išsėja ant standžios Čapeko terpės su mazutu, kaip vienintelės anglies ir energijos šaltinio, po to vėl kultivuoja 4 - 6 paras apie 30°C temperatūroje, užaugusias izoliuotas bakterijų kolonijas persėja į mėgintuvėlius ant įžambaus Čapeko terpės agaro su mazutu, po to lygina išskirtų kultūrų aktyvumą ir išrenka aktyviausiai skaidantį naftos produktus kamieną, kurį vadovaujantis Bergey'o apibūdintoju, apibūdina kaip *Arthrobacter globiformis* MD18.
4. Mikroorganizmo kamienas *Arthrobacter globiformis* MD18, skirtas panaudoti pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad *Arthrobacter globiformis* MD18 kamieną naudoja nafta ir naftos produktais užteršto dirvožemio vietiniam valymui, tam fermentatoriuje, Čapeko terpėje užaugina minėto mikroorganizmo kultūrinį skystį, kurį praskiedžia medžiagų, reikalingų minėto mikroorganizmo mitybai, vandeniniu tirpalu, gautą suspensiją paskleidžia dirvožemio sluoksnyje, kurį po to maišo ir purena periodiškai 1 kartą per savaitę natūraliomis sąlygomis 2-3 mėnesių laikotarpyje, esant oro temperatūrai 15 - 22° C.
5. Mikroorganizmo kamienas *Arthrobacter globiformis* MD18, skirtas panaudoti pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad *Arthrobacter globiformis* MD18 kamieną naudoja nafta ir naftos produktais užteršto dirvožemio valymui aikštelėje, tam dirvožemį sumaišo su trąšomis, turinčiomis N ir P ir/arba kitų medžiagų, reikalingų minėto

mikroorganizmo dauginimuisi, patikrina mišinio pH, esant pH mažesniau už 4, mišinį kalkina, po to dirvožemį paskleidžia apie 0,5 m storio sluoksniu, apipurškia suspensija, gauta fermentatoriuje Čapeko terpėje užaugintą minėto mikroorganizmo kultūrinį skystį praskiedus mikroorganizmo mitybai reikalingų medžiagų vandeniniu tirpalu, po to dirvožemį permaišo ir išlaiko natūraliomis sąlygomis 2-3 mėnesius, esant oro temperatūrai 15 - 22° C.

6. Mikroorganizmo kamienas *Arthrobacter globiformis* MD18, skirtas panaudoti pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad *Arthrobacter globiformis* MD18 kamieną naudoja nafta ir naftos produktais užteršto dirvožemio valymui, tam į dirvožemį deda trąšų, turinčių N ir P ir/arba kitų medžiagų, reikalingų minėto mikroorganizmo dauginimuisi, įdeda susmulkintų šiaudų, sumaišo, patikrina mišinio pH, esant pH mažesniau už 4, mišinį kalkina, po to supila į kaupą, kuriame įrengia aktyvią arba pasyvią vėdinimo sistemą, kaupą apipurškia suspensija, gauta fermentatoriuje Čapeko terpėje užaugintą minėto mikroorganizmo kultūrinį skystį praskiedus mikroorganizmo mitybai reikalingų medžiagų vandeniniu tirpalu, ir kuo giliau dirvožemį permaišo ir išlaiko natūraliomis sąlygomis 1-2 mėnesius, esant oro temperatūrai 15 - 20° C.

7. Mikroorganizmo kamienas *Arthrobacter globiformis* MD18, skirtas panaudoti pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad *Arthrobacter globiformis* MD18 kamieną naudoja nafta ir naftos produktais užteršto vandens telkinio valymui, tam užterštą plotą izoliuoja nuo tolimesnio pasiskleidimo ir užteršto vandens paviršių apipurškia suspensija, gauta fermentatoriuje Čapeko terpėje užaugintą minėto mikroorganizmo kultūrinį skystį praskiedus minėto mikroorganizmo mitybai reikalingų medžiagų vandeniniu tirpalu, ir išlaiko natūraliomis sąlygomis 2 - 4 savaites, esant oro temperatūrai 15 - 22° C.

8. Mikroorganizmo kamienas *Arthrobacter globiformis* MD18, skirtas panaudoti pagal 4-7 punktus, besiskiriantis tuo, kad fermentatoriuje Čapeko terpėje išaugina minėto mikroorganizmo 100 l kultūrinio skysčio (8-10 g/l sausos masės) ir praskiedžia 1×10^3 l druskų NaNO_3 - 4g/l, K_2HPO_4 - 0,6 g/l, Na_2HPO_4 - 0,6 g/l vandeniniu tirpalu.