



(10) **LT 4793 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **4793** (51) Int. Cl.⁷: **C12N 1/16**
C02F 3/34
B09C 1/10
- (21) Paraiškos numeris: **2000 059**
- (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
Algimantas PAŠKEVIČIUS, LT
Jūratė REPEČKIENĖ, 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 *Candida lipolytica* C. 6.1-5, oksiduojantis naftą ir jos produktus

- (57) Referatas:
Išradimas priklauso ekologijos ir mikrobiologijos sritims, būtent, mikroorganizmų štamams, oksiduojantiems naftą ir jos produktus. Siūlomas štamas gali būti panaudotas grunto, vandens, užteršto nafta

arba naftos produktais, biologiniam valymui. Štamas *Candida lipolytica* C.6.1-5 (deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje (LT), kolekcinis numeris IBL:Y-12), pasižymi stipriai išreikštu anglavandenilių destrukciniu aktyvumu.

Išradimas priklauso ekologijos ir mikrobiologijos sritims, būtent mikroorganizmų štamams, oksiduojantiems naftą ir jos produktus. Siūlomas štamai gali būti panaudotas grunto, vandens, užteršto nafta arba naftos produktais, biologiniam valymui.

Žinomas mielių *Candida guilliermondii* БКПМ У- 241 štamai, aprašytas patento RU 2 007 372, C02F 3/34, E02B 15/04, aprašyme (deponuotas ЦМПМ ВНИИ Синтезбелок). Šis štamai naudojamas vandens ir grunto, užteršto nafta arba naftos produktais, valymui. Užterštą aplinką apdoroja mielių *Candida guilliermondii* БКПМ У- 241 ląstelių suspensija mineralinių azoto ir fosforo trąšų terpėje.

Šio štamai trūkumas yra tas, kad jis yra nepakankamai efektyvus sunkių naftos frakcijų, pavyzdžiui, mazuto biovalymui.

Žinomas naftos produktais užteršto grunto ir vandens mikrobiologinio valymo būdas, aprašytas patento RU 2 014 286, C02F 3/34, E02B 15/04, aprašyme, kai naftos produktais užterštas vanduo arba gruntas apvalomi naftą oksiduojančių mikroorganizmų asociacija: *Candida tropicalis* + *Mycococcus* arba *Micococcus lactis* + *Micococcus lactis*, arba *Candida guilliermondii* + *Acinetobacter oleovorun subsp. parafinium*.

Minėtos mikroorganizmų kompozicijos trūkumas yra nepakankamas skirtingos sudėties naftos teršalų bei kitų angliavandenilių ardymas. Be to mikroorganizmų asociacija nėra stabili gamtinėje aplinkoje. Sunku parinkti kiekybinę mikroorganizmų asociacijos sudėtį, kuri leistų pilnai ir greitai suardyti teršalus.

Žinoma mikroorganizmų asociacija, pavadinta "Devouroil", aprašyta patento RU 2 023 686, C02F 3/34, E02B 15/04, aprašyme. Į šią asociaciją įeina *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri* ir *Candida sp.*. Šis mikroorganizmų rinkinys skirtas vandens paviršiaus ir grunto, užteršto naftos produktais, išvalymui.

Šios mikroorganizmų asociacijos pagrindinis trūkumas tas, kad ji labiau tinka sūriam jūros vandeniui ar druskingam gruntui išvalyti. Be to ši asociacija aromatinius angliavandenilius ir naftenus oksiduoja silpnai.

Išradimo tikslas – išskirti naftą ir jos produktus oksiduojantį mielių štamą, kurį galima būtų panaudoti užteršto grunto ir vandens išvalymui suintensyvinti.

Siūlomas mielių *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamas buvo išskirtas iš Vilniaus miesto Naftos bazės teritorijos dirvožemio. Išskyrimo būdas apima dirvožemio vandeninės suspensijos paruošimą, paruoštos dirvožemio suspensijos užsėjimą ant agarizuotos sintetinės gliukozės-amonio terpės tokios sudėties (g/l): gliukozė – 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5; KH_2PO_4 – 0.85; K_2HPO_4 – 0.15; MgSO_4 – 0.5; NaCl – 0.1; CaCl_2 – 0.1; levomicetinas – 0.1; agaras – 20; vanduo – 1000 ml. Mielių kultūra buvo auginama 4 paras, termostate $26 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje. Mielių identifikacija atlikta remiantis morfologiniais, fiziologiniais ir biocheminiais požymiais, naudojant N. J. W. Kreger – van Rij (1984) klasifikacinę sistemą.

Štamas *Candida lipolytica* C. 6.1-5 deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijos mikroorganizmų kolekcijoje 1998 m. rugsėjo mėn. 6 d., kolekcinis numeris IBL: Y – 12.

Siūlomas mielių *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamas pasižymi žemiau išvardintomis savybėmis.

Morfologinės savybės. Po 3 parų kultivavimo skystoje salyklo ekstrakto terpėje, esant 25°C temperatūrai, ląstelės ovališkos arba ištemptos, $(2-4.5) \times (4-22) \mu\text{m}$. Pumpuruoja siauru, kartais plačiu pagrindu. Skystoje terpėje formuoja plėvelę ir nuosėdas. Stebimas pseudomicelis arba tikras micelis.

Agarizuotoje salyklo terpėje po 1 mėnesio kultivavimo kultūra kreminės spalvos, drėgna, minkšta, švelniai raukšlėta arba klostėta. Mikroskopuojant stebimas pseudomicelis ir šakotas, septuotas tikras micelis. Kartais formuoja artrosporas. Blastosporos yra sujungtos į mažas grandinėles.

Fiziologinės savybės. Rūgimo proceso nevykdo. Kaip vienintelį anglies šaltinį gali asimiliuoti: gliukozę, L – sorbozę, etanolį, glicerolį, eritritolį, D – manitą, pieno, gintaro ir citrinos rūgštį, n-heksadekaną, n-dekaną, naftaliną, naftą, mazutą. Neasimiliuoja: galaktozės, D – ribozės, L – ramnozės, sacharozės, maltozės, celobiozės, tregahozės, laktozės, melibiozės, rafinozės, melecitozės, inulino, krakmolo, D – ksilozės, L ir D – arabinozės, adonitolio (ribitolio), salicilo, inozito. Arbutino hidrolize nepasižymi. Produkuoja rūgštis. Bevitamininėje terpėje (Vitamin free yeast base “DIFCO”, JAV) auga. Augimą stimuliuoja tiaminas. Optimali augimo temperatūra 27°C . Maksimali augimo temperatūra $33-37^\circ\text{C}$. Optimalus pH 5,0 - 5,5.

Fermentinis aktyvumas. Kokybiniais atrankos metodais nustatyta, kad štamas pasižymi ureaziniu ir lipaziniu fermentiniu aktyvumu.

Štamo laikymas. Štamas laikomas ant agarizuotos gliukozės-amonio terpės, mėgintuvėliuose. Reguliariai persėjamas. Į saugomo štamo mitybinę terpę įterpiami naftos angliavandeniliai. Štamai laikomi +4°C temperatūroje.

Siūlomo štamo pirminė atranka buvo atlikta panaudojant kokybinius metodus. Atranka buvo atliekama ant agarizuotos mitybinės terpės tokios sudėties (g/l): mazutas – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5; KH_2PO_4 – 0.85; K_2HPO_4 – 0.15; MgSO_4 – 0.5; NaCl – 0.1; CaCl_2 – 0.1; agaras – 20; vanduo – 1000 ml. Štamas augintas 5 paras termostate, $26 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje. Terpės pH 5. Naftą ir jos produktus oksiduojančio štamo aktyvumas buvo įvertintas pagal susidariusias skaidrias zonas aplink mikroorganizmą.

Terpės sudėties optimizavimo metodu, modifikuotoje Čapeko terpėje pagal absoliučiai sausos biomasės (ASB) kiekį buvo įvertinta įvairių fosforo šaltinių (kaulamilčių, superfosfato, Kemira Horti – 2 (NPK 6-12-24)) įtaka naftos produktus oksiduojančių mielių *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamo augimui. Tyrimų duomenys pateikiami 1 lentelėje.

1 lentelė. Įvairių fosforo šaltinių įtaka *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamo augimui

Fosforo šaltinio pavadinimas	Fosforo kiekis, g/l	Absoliučiai sausos biomasės svoris, g/l
Kontrolė (KH_2PO_4)	0.23	8.2 ± 0.1
Kaulamilčiai	0.115	11.1 ± 0.1
	0.23	13.6 ± 0.2
	0.345	12.4 ± 0.1
Kemira Horti – 2 (NPK 6-12-24)	0.115	6.2 ± 0.1
	0.23	7.5 ± 0.2
	0.345	5.1 ± 0.1
Superfosfatas	0.115	2.36 ± 0.04
	0.23	2.90 ± 0.03
	0.345	5.70 ± 0.10

Iš pateiktų duomenų matyti, kad įvairūs fosforo šaltiniai nevienodai veikia atrinkto štamo augimą. Nustatyta, kad didžiausias ASB kiekis buvo gautas kultivuojant atrinktą štamą su

kaulamilčiais. Kultivuojant su superfosfatu ir Kemira Horti - 2 trąšomis ASB kiekis buvo mažesnis nei kontrolėje (1 lentelė).

Siūlomo mielių štamo gebėjimas ardyti naftą ir jos produktus bei kai kuriuos aromatinius angliavandenilius pateikiamas pavyzdžiuose.

1 pavyzdys

Siūlomas mielių *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamas kultivuojamas modifikuotoje Čapeko terpėje giluminiu būdu, kratyklėse. Terpės vieninteliu anglies šaltiniu buvo nafta. Terpės sudėtis (g/l): kaulamilčiai – 1.75; $Mg\ SO_4$ – 0.5; $Fe\ SO_4$ – 0.001; NH_4NO_3 – 1.5; KCl – 0.5; vanduo – 1000 ml. Terpės pH 5.0 – 5.5. Kultivavimo temperatūra $26 \pm 2^\circ\ C$. Kiekybinė naftos analizė po 7 ir 20 parų mielių kultivavimo buvo atlikta spektrometrijos metodu panaudojant naftos analizatorių ANVP –79.

Nustatyta, kad po 7 parų kultivavimo naftos kiekis sumažėjo 82.18%, o po 20 parų – 90.67 %.

2 pavyzdys

Atrinktas mielių štamas buvo kultivuojamas terpėje, kurioje vieninteliu anglies šaltiniu buvo mazutas. Terpės sudėtis (g/l): mazutas – 10; $(NH_4)_2SO_4$ – 5; KH_2PO_4 – 0.85; K_2HPO_4 – 0.15; $MgSO_4$ – 0.5; NaCl – 0.1; $CaCl_2$ – 0.1; vanduo – 1000 ml. Terpės pH 5.0-6.5. Štamas kultivuotas giluminiu būdu, kratyklėse. Auginimo temperatūra $26 \pm 2^\circ\ C$. Mazuto kiekybinis įvertinimas atliktas po 7 ir 20 parų *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamo kultivavimo. Nustatyta, kad po 7 parų kultivavimo mazuto kiekis sumažėjo 51.89 %, o po 20 parų – 81.68 %.

3 pavyzdys

Atliktas bandymas, kuris savo parametrais atitinka 1 pavyzdyje aprašytą bandymą. Atrinktas štamas buvo kultivuojamas tos pačios sudėties terpėje, kaip ir 1 pavyzdyje. Skirtumas tas, kad vieninteliu anglies šaltiniu buvo pasirinktas aromatinis angliavandenilis – naftalinas 10 g/l. Kiekybinė naftalino analizė, po *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamo kultivavimo, atlikta dujų chromatografijos masspektrometrijos metodu panaudojant dujų chromatografą – masspektrometrą "Saturn 3".

Nustatyta, kad po 7 parų kultivavimo naftalino kiekis sumažėjo 64.91 %, o po 20 parų net 85.01%.

4 pavyzdys

Naftos produktais užteršto grunto valymas. Valymo aikštelėje yra 100 tonų užteršto grunto, kurio pH 5.0 - 5.5. Naftos produktų 35 g/kg. Gruntas paskleidžiamas 0.5 m storio sluoksniu. Paruošiama *Candida lipolytica* C. 6.1-5 štamo suspensija ir sumaišoma su vandeniniu druskų tirpalu, į kurio sudėtį įeina 30 mg/l azoto (naudojamas amonio sulfatas) ir 25 mg/l fosforo (kaulamilčiai). Ląstelių titras tirpale apie 3×10^7 ląstelių/ml. Paruoštas tirpalas įterpiamas į valomą gruntą jį išpurškiant 3 l/m² kiekiu. Valomas ir tręšiamas NPK mineralinėmis trąšomis gruntas perkamas, o vėliau kultivuojamas kas savaitę. Natūraliomis sąlygomis, esant oro temperatūrai ne žemesnei kaip 14 °C, dirvožemio išvalymo procesas trunka 1.5–2.5 mėnesio. Teršalų kiekis sumažėja 91.02 %.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Štamas *Candida lipolytica* C. 6.1-5 (deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje (LT), kolekcinis numeris IBL:Y – 12), oksiduojantis naftą ir jos produktus, pasižymintis stipriai išreikštu angliavandenilių destrukciniu aktyvumu.
2. Štamas *Candida lipolytica* C. 6.1-5, skirtas naftos produktais užteršto vandens ir grunto valymui.
3. Štamo *Candida lipolytica* C. 6.1-5 pagal 1 punktą gavimo būdas, b e s k i r i a n t i s tuo, kad štamo biomasę auginama laboratorinėmis sąlygomis, naudojant skirtingas mitybines terpes, jos augimui palaiko temperatūrą ribose 14 – 29 °C ir pH ribose 5.0 – 6.5, po to ruošia suspensiją, kurią sumaišo su vandeniniu druskų tirpalu, į kurio sudėtį įeina 30 mg/l azoto ir 25 mg/l fosforo, ląstelių titras tirpale 3×10^7 ląstelių/ml natūraliomis sąlygomis, tinkamomis mieliagrybiui daugintis.