



(10) **LT 4794 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **4794**
- (51) Int. Cl.⁷: **C12N 1/14**
B09C 1/10
- (21) Paraiškos numeris: **2000 060**
- (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 *Trichoderma harzianum* VNB-16, skaidantis mazutą, jo gavimo būdas ir panaudojimas**
- (57) Referatas:
- Išradimas priklauso mikrobiologijos, biotechnologijos sritims, būtent, mikroorganizmų štamams,

skaidantiems angliavandenilius, jų gavimo būdui ir gali būti panaudotas naftos produktais užteršto dirvožemio (grunto) valymui, jo toksiškumo augalams sumažinimui ir galutiniam dirvožemio struktūros bei jo biologinių savybių atstatymui. Štamas *Trichoderma harzianum* VNB-16 (deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje (LT), kolekcijos Nr. IBL: F-431) - naftos produktus skaidantis štamas, introdukuotas išlieka aktyvus grunte, antagonistiškai veikia jame esančius fitopatogeninius mikroorganizmus ir sumažina naftos produktais užteršto dirvožemio toksiškumą augalams.

Išradimas priklauso mikrobiologijos, biotechnologijos sritims, būtent, mikroorganizmų štamams, skaidantiems angliavandenilius, ir gali būti panaudotas užteršto naftos produktais dirvožemio (grunto) valymui.

Žinomas bakterijos *Rhodococcus erythropolis* štamas BKM Ac-1339D, aprašytas aut. I. SU 1 805 097, C02F 3/34, išradimo aprašyme. Šis štamas naudojamas vandens ir dirvos valymui nuo naftos ir naftos produktų.

Štamo trūkumas – bakterijos geba degraduoti tirpius angliavandenilius. Nepasižymi gebėjimu skaldyti mazutą. Be to, bakterijos, įterptos į dirvožemio mikroorganizmų bendriją, sunkiau išsilaiko kitų mikroorganizmų aplinkoje.

Žinomas mikromicetas *Candida guilliermondii* BKM Y-241, aprašytas patento RU 2 007 372, C02F 3/34, E02B 15/04, aprašyme. Šis štamas naudojamas vandens ir dirvos apvalymui nuo užteršimo nafta ir naftos produktais.

Šio štamo trūkumas – nesugeba skaldyti mazutą. Mikromicetas negerina dirvožemio struktūros, sunkiau dauginasi patekęs į natūralias dirvožemio mikroorganizmų bendrijas.

Artimiausias savo veikimu siūlomam štamui yra štamas *Actinomucor elegans* TC-405, aprašytas patento US 4 415 662 aprašyme. Šis štamas yra naftos ir naftos produktų biodestruktorius.

Šio štamo esminis trūkumas – naudojamas naftos produktams skaldyti vandenyje, negerina dirvožemio struktūros ir nepasižymi antagonistinėmis savybėmis fitopatogeniniams mikroorganizmams.

Išradimo tikslas – išskirti štamą, kuriam būdingas gebėjimas skaldyti naftos angliavandenilius, tame tarpe mazutą, įgalinantis pagreitinti naftos produktų utilizaciją dirvožemyje, atstatyti jo struktūrą ir biologinį aktyvumą.

Siūlomas mikroorganizmo štamas buvo išskirtas iš Vilniaus naftos produktų bazės teritorijos užteršto smėlio, prisotinto industriniais tepalais. Išskyrimo būdas apima dirvožemio vandeninės suspensijos paruošimą; paruoštos suspensijos užsėjimą ant agarizuotų alaus misos ir modifikuotos Čapeko terpių, kai anglies šaltiniu naudojamas 1% mazuto. Tokia terpė naudojama naftą oksiduojančių mikromicetų štamų aptikimui, kultūros išgryninimui ir monosporinės kultūros išskyrimui. Mikromicetas auginamas termostate prie 26 ± 2 °C temperatūros 7 paras, štamas identifikuotas pagal kultūrinius ir morfologinius požymius naudojant M. A. Rifai klasifikaciją.

Štamas deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijos mikroorganizmų kolekcijoje, kolekcinis numeris IBL: F-431.

Siūlomas štamas *Trichoderma harzianum* VNB-16, auginant jį ant skirtingų terpių, pasižymi tokiomis savybėmis:

Morfologinės savybės

Agarizuota alaus misos terpė. Kolonijos auga greitai. Po 3 parų kolonijos pasiekia 50 mm, o po 5 parų – 90 mm diametrą. Kolonijos paviršius tamsiai žalios spalvos, micelis tankus, gana aukštas, purus su daugeliu vatos pavidalo gniužulėlių. Apatinė kolonijos pusė bespalvė. Kultūros kvapas specifinis.

Agarizuota Čapeko mineralinė terpė. Kolonijos auga lėčiau – po 3 parų siekia 35, po 7 – 90 mm skersmenį. Kolonijos šviesiai žalsvos su baltais ir žalsvais puriais micelio gniužulėliais. Kolonijos apatinė pusė gelsva.

Saburo-dekstrozės agarizuota terpė. Kolonijos auga greitai, po 3 parų siekia 45, po 5 – 90 mm skersmenį. Micelis labai tankus, auga koncentriškais žiedais, kolonijos kraštas – gelsvos, į centrą – žalsvos spalvos. Apatinė kolonijos pusė oranžinė.

Hifai septuoti, išsišakoję, lygiasieniai, bespalviai, 1,5-10,0 μ skersmens. Šoninės šakelės dažniausiai išsidėsčiusios grupėmis po 2-3.

Fialidės trumpos, kėgliškos, 4,5-8,0 x 2,5-3,5 μ dydžio, dažniausiai išsidėsto grupėmis po 5, bet gali būti pavienės.

Konidijos smulkios, rutulio arba trumpo ovalo formos, lygiasienės, žalios spalvos, išsidėsčiusios fialidžių viršūnėse. sudaro rutulio pavidalo netikras galvutes. Vidutiniškas konidijų dydis 2,8-3,2x2,5-2,8 μ .

Fiziologinės savybės

Anglies šaltiniai: štamai gerai įsisavina gliukozę, sacharozę, galaktozę, ksilozę, karboksimetilceliuliozę. Silpniau įsisavina organinių rūgščių druskas, krakmolą, gliceriną.

Azoto šaltiniai: štamai gerai įsisavina amonio druskas, NaNO_3 , peptoną, asparaginą. Silpnai įsisavina kazeiną.

Štamai gerai auga ant gamtinių substratų, pavyzdžiui, augalų atliekų, grūdų. Aerobai. Augimo temperatūra 15-36°C, optimali – 26-30°C. Auga terpėje, kurios rūgštingumas – pH 4-7.

Štamai pasižymi fermentiniu aktyvumu: produkuoja proteazes, celiulazes. Nebūdinga tirozinazės, lakazės sintezė.

Antagonistinės savybės

Štamai pasižymi dideliu antibiotiniu poveikiu į kai kuriuos fitopatogeninius grybus, pvz., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria alternata*. Tačiau jis nėra antagonistas naftos angliavandenilius skaldančioms bakterijoms ir mikromicetams-mielėms, o pastarųjų (*Candida lipolytica*, *Rhodotorula lactosa*, *Rhodotorula sp.* ir kt.) augimą netgi stimuliuoja.

Štamo gebėjimas oksiduoti naftos angliavandenilius buvo vertinamas pagal augimą ant agarizuotos Čapeko terpės su 1% dyzelinio kuro ir mazuto. Mikromiceto štamų kolonijų diametras (mm) po 7 parų auginimo ant Čapeko terpės ir Čapeko terpės su naftos produktais pateikiamas 1 lentelėje.

1 lentelė

Mikromiceto rūšis	Štamo numeris	Čapeko terpė	Čapeko terpė su mazutu	Čapeko terpė su dyzeliniu kuru
<i>Trichoderma harzianum</i>	VNB-16	90	90	90
<i>Penicillium verruculosum</i>	MN-1	32	12	23

Ant mineralinės Čapeko terpės su 1% mazuto štamo *Trichoderma harzianum* kolonijos auga greitai – po 7 parų pasiekia 90 mm skersmenį. Kolonijos plonos, micelis žemas, silpniau gamina žalią pigmentą, kolonijos pilkos spalvos su baltais gniužulėliais.

Štamas, augdamas mineralinėje terpėje su mazutu naudoja įvairius fosforo šaltinius: kaulamilčius, superfosfatą, Kemira-Horti 2 trąšas (NPK 6:12:24). Siūlomo *Trichoderma harzianum* VNB-16 štamo augimo kolonijų diametras (mm) po 7 parų ant agarizuotų terpių su įvairiomis trąšomis bei mazutu pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė

Kontrolė (KH ₂ PO ₄)		Kaulamilčiai			Superfosfatas			Kemira-Horti 2		
Fosforo šaltinio koncentracija, g/l										
1		0,8	1,6	2,4	0,5	1	1,5	0,4	0,75	1,1
Kolonijos skersmuo, mm										
43		90	90	90	52	48	45	45	50	42

Geriausiai orinio micelio formavimąsi, augant terpėje su mazutu veikia 0,4 ir 0,75 g/l Kemiros trąšų bei 1 g/l superfosfato priedas.

Skystoje terpėje su Kemiros trąšomis ir mazuto bei dyzelinio kuro mišiniu (santykis 1:1) siūlomas štamas auga gerai, mazutas per 7 paras suskyla į mažus dribsnius. Biomasės prieaugis pateikiamas 3 lentelėje.

3 lentelė

Variantas	Biomasė g/50 ml
Kontrolė (KH ₂ PO ₄ - 1,0 g/l)	0,040
Kemira 0,40 g/l	0,027
Kemira 0,75 g/l	0,056

Daržo dirvožemis (400 g) supilamas į vegetacinius indus, į juos įpilama 50 ml mikroorganizmų pagalba dekaduoto mazuto. Užkrečiama siūlomo štamo suspensija $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ pradų/g. Į dirvožemį pasodinami lubinai. Po 6 savaičių auginimo mikrobiologinė analizė parodė, kad mikromicetas išgyveno ir vystėsi mazuto atliekomis užterštame dirvožemyje. Angliavandenilių kiekis per šį laikotarpį tiriamame dirvožemyje sumažėjo nuo 2388 iki 370 mg/l, t.y. 6,5 karto.

Aukščiau pateiktų duomenų apibendrinimas rodo, kad siūlomas štamas *Trichoderma harzianum* VNB-16 pasižymi gebėjimu skaldyti mazutą ir gali būti naudojamas naftos produktų utilizacijai pagreitininti bei dirvožemio kokybei atstatyti.

1 pavyzdys

Siūlomo *Trichoderma harzianum* VNB-16 štamo auginimas skystoje mineralinėje terpėje pridedant kaip vienintelį anglies šaltinį naftos angliavandenilius.

Pagaminama skysta mitybinė mineralinė terpė tokios sudėties (g/l):

NH ₄ NO ₃	1,5
KH ₂ PO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001
Distiliuotas vanduo	1,000 ml

Pridedama mazuto arba naftalino 1% kaip vienintelio anglies šaltinio. Išpilstoma po 50 ml į 500 ml talpos kratyklines kolbas. Terpė sterilinama autoklavuojant 30 min.

prie 0,5 atm. Į ataušusią terpę užsėjama 2 ml 7 parų amžiaus štamo *Trichoderma harzianum* sporų suspensijos. Štamas inkubuojamas ant kratytuvų 7-20 parų prie $26\pm 2^{\circ}$ temperatūros. Po 7 auginimo parų mazutas suskyla į smulkius dribsnius, o po 20 parų lieka tik šviesiai rudas skystis.

Suskaldyto naftos produkto kiekis auginant štamą 7 ir 20 parų pateikiamas 4 lentelėje.

4 lentelė

Naftos Produktas	Pradinis angliavandenilių kiekis mg/100 ml	7 paros		20 parų	
		Likutis	Suskaldyta	Likutis	Suskaldyta
Naftalinas	719	406,4	43,5%	60,5	91,5%
Mazutas	715	644,2	10,0%	–	–

Iš pateiktų duomenų matyti, kad siūlomas štamas *Trichoderma harzianum* VNB-16 skaldo platų angliavandenilių spektrą: angliavandenilius, kurie sudaro sunkiąsias naftos frakcijas – naftaliną ir mazutą.

2 pavyzdys

Siūlomo štamo *Trichoderma harzianum* VNB-16 panaudojimas naftos produktų utilizacijai dirvožemyje kompostavimo būdu.

Substrato užkratui mikromiceto biomasę auginama laboratorijoje steriliomis sąlygomis. Po 6-7 parų kultivavimo ant agarizuotos alaus misos terpės $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ruošia mikromiceto sporų suspensiją. Konidijos nuplaunamos steriliu fiziologiniu tirpalu ir gauta suspensija praskiedžiama, palaikant grybų pradų titrą $1\times 10^6 - 1\times 10^7/1$ ml. Paruoštą suspensiją naudoja užteršto grunto užkrėtimui.

Naftos produktais užterštas gruntas sukasamas į krūvas, sumaišomas su azotinėmis bei fosforo trąšomis, aplaistomas arba apipurškiamas mikromiceto sporų suspensija, gerai permaišomas. Užkrėstas mikromicetu substratas natūraliomis sąlygomis (esant $10 - 30^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, palaikant optimalią kompostuojamo grunto drėgmę) laikomas

2 - 3 mėnesius, periodiškai sekamas mikromiceto vystymasis ir naftos produkto kaita valomajame grunte.

Aukščiau aprašytu būdu valant gruntą, lyginant su kontroliniu pavyzdžiu, kuriame nebuvo inokuliuotas *Trichoderma harzianum* VNB-16 užkratas, po 30 d. mazuto sumažėjo 85% . Grunto konsistencija pasikeitė. Jis pasidarė puresnis, prarado naftos kvapą.

3 pavyzdys

Aukščiau aprašyto apvalyto nuo naftos produktų grunto panaudojimas augalų auginimui - galutinei dirvožemio remediacijai.

Apvalytas nuo naftos produktų gruntas nėra toksiškas aukštesniesiems augalams. Sėklų daigumas mazutu užterštame grunte be mikromiceto *Trichoderma harzianum* VNB-16 buvo 50%, su *Trichoderma harzianum* VNB-16 – 80 %. Lubinų žaliosios masės prieaugis per 2 savaites – atitinkamai 0,86 ir 1,46 g/egz.

Apvalytas gruntas gali būti panaudtas augalams auginti ir galutinai atstatyti dirvožemio struktūrą bei jo biologines savybes, kadangi introdukuotas mikromiceto *Trichoderma harzianum* VNB-16 štamas išlieka aktyvus dirvoje, antagonistiškai veikia fitopatogeninius mikroorganizmus ir sumažina naftos produktais užteršto dirvožemio toksiškumą augalams.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Štamas *Trichoderma harzianum* VNB-16 (deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje (LT), kolekcijos Nr. IBL: F-431) - naftos produktus skaidantis štamas, antagonistiškai veikiantis fitopatogeninius mikroorganizmus ir sumažinantis naftos produktais užteršto dirvožemio toksiškumą augalams.
2. Štamas *Trichoderma harzianum* VNB-16 skirtas panaudoti naftos produktais užteršto dirvožemio valymui ir atstatymui.
3. Štamo *Trichoderma harzianum* VNB-16 pagal 1 punktą gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad paruošia naftos produktais užteršto grunto vandeninę suspensiją, paruoštą suspensiją užsėja ant agarizuotų alaus misos ir modifikuotos Čapeko terpės, kai anglies šaltiniu yra 1% mazuto, tokią terpę panaudoja naftą skaidančių mikromicetų štamų aptikimui, jų kultūros išgryninimui ir monosporinės kultūros išskyrimui, mikromicetą augina termostate prie $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūros 7 paras ir štamą identifikuoja pagal kultūrinius ir morfologinius požymius naudojant M. A. Rifai klasifikaciją.
4. Štamo *Trichoderma harzianum* VNB-16 pagal 1 ir 2 punktus, gauto pagal 3 punkto būdą panaudojimo mazutu užteršto grunto valymui būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mikroorganizmo biomasę augina mitybinėse terpėse laboratorinėmis sąlygomis, po to ruošia mikromiceto biomasės vandeninę suspensiją, kurioje mikromiceto pradų titras yra apie 10^5 - 10^7 /1 ml, iš anksto paruoštą substratą užkrečia mikromiceto suspensija jį laistant arba apipurškiant minėta suspensija, po to substratą permaišo ir palaiko drėgmę, tinkamą štamui daugintis ir išlikti aktyviam substrate-grunte.
5. Apvalyto būdu pagal 4 punktą grunto panaudojimas augalams auginti ir galutinai atstatyti dirvožemio struktūrą bei jo biologines savybes.