



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 14730 (13) A  
(51) 6 C 12 N 1/14ОПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті  
на підставі Постанови Верховної Ради України  
№ 3769-XII від 23.XII. 1993 р.Публікується  
в редакції заявника(54) ШТАМ ГРИБА CLADOSPORIUM CLADOSPORIODES (FRES) DE VRIES 5, ЩО ЗАСВОЮЄ  
РАДІОАКТИВНИЙ ГРАФІТ

1

(21) 95042142.

(22) 27.04.95

(24) 04.02.97

(46) 30.06.97. Бюл. № 3

(47) 04.02.97

(56) 1. Ellis M.B. Dematiaceous hyphomycetes.  
- Commonwealth Myco Inst. Kew, Surrey,  
England, 1971, p. 319.2. M. Zrezos a B. Valesky. The  
mechanism of uranium biosorption by Rhizopus  
arrhizus. Biotechnol. a Bioengin., 1982, 24,  
2, 385-401.3. M. Zrezos a B. Valesky. The mechanism  
of thorium biosorption by Rhizopus

2

arrhizus. Biotechnol. a Bioengin., 1982 24, 4,  
955-969.(72) Жданова Неллі Миколаївна, Захарченко  
Валентина Олексіївна, Наконечна Лідія Тео-  
дорівна, Вембер Валерія Володимирівна,  
Пушкарьов Олександр Васильович, Сабото-  
вич Емлен Володимирович, Ковалюк Мико-  
лай Миколайович(73) Інститут мікробіології та вірусології ім.  
Д.К. Заболотного НАН України (UA)(57) Штам гриба Cladosporium  
cladosporioides (Fres.) de Vries 5, що засвоює  
радіоактивний графіт.

Винахід відноситься до галузі  
мікробіології та радіоекології, а саме до но-  
вого штаму мікроскопічного гриба, здатного  
руйнувати та засвоювати радіоактивний  
графіт.

Графіт – природна чисто вуглецева речо-  
вина із специфічною кристалічною ґраткою.  
Використовується в реакторах на атомних  
електростанціях як уповільнювач нейтронів.  
При цьому він накопичує радіоактивні  
ізотопи вуглецю, стронцію, цезію, плутонію  
та ін. Під час аварії на ЧАЕС багато  
радіоактивного графіту (біля 400 т) було ви-  
кинуто в навколишнє середовище. Актуаль-  
ним залишається питання його руйнування і  
переведення в доступну для рослин форму.  
Графіт вважається важкодоступним суб-

стратом для мікроорганізмів із-за міцних  
зв'язків між атомами кристалічної ґратки.

Із літератури відомо, що мікроміцети мо-  
жуть приймати участь в адсорбції речовин із  
актиноїдного ряду. Так, гриб Rhizopus –  
arrhizus здатний вести адсорбцію у водному  
розчині торію при концентрації 30–100 мг/л  
[3]. Той же гриб було використано при ад-  
сорбції урану із водного середовища при  
концентрації останнього 100 мг/л [2]. В ос-  
нові такого явища лежить фізико-хімічний  
процес взаємодії іонів важких металів та ви-  
ще згаданих радіоактивних сполук з актив-  
ними центрами клітинної оболонки. Останні  
здебільшого зосереджені у біополімерах, що  
створюють скелет клітинної оболонки, серед  
них головне місце належить хітинам,  
пігментам і в меншій мірі полісахаридам.

(19) UA (11) 14730 (13) A

Процес адсорбції відбувається тільки при наявності конкурентних іонів Cu, Zn, Fe. Хітинова кристалічна гратка активно приймає участь у цьому процесі при використанні не тільки живої, але й мертвої культури.

На відміну від цього процес трансформації радіоактивного графіту відноситься до більш прогресивної форми. При цьому гриб здатний використовувати радіоактивний графіт, як джерело вуглецю активно включати його до своїх метаболічних шляхів. Суттєво, що така трансформація включає процеси ресорбції графіту, тобто вона відноситься до незворотніх процесів.

У доступній нам літературі ми не знайшли відомості про гриби, які здатні вести себе аналогічно нашому штаму.

Задача винаходу є новий штам гриба, який здатний трансформувати і використовувати радіоактивний графіт в якості єдиного джерела вуглецю.

Задача вирішується використанням штаму *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries 5, який активно росте на середовищі із 10 г/л радіоактивного графіту (активність 2100 Бк), доданому у мінеральне середовище Чапека в якості єдиного джерела вуглецю. Він перспективний для прискорення процесів руйнування реакторного графіту та вміщуючих графіт гарячих частинок.

Новий штам *Cladosporium cladosporioides* виділений та ідентифікований [1] у відділі фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології НАН України. Штам вилучено з уламків радіоактивного графіту, зібраних у 1986 році поблизу четвертого енергоблоку ЧАЕС. Уламки зберігались у водному середовищі, в спеціальному контейнері в Інституті геохімії, мінералогії та рудоутворення НАН України. Штам депонований в Інституті мікробіології та вірусології НАН України під № 5.

Культурально-морфологічні ознаки.

Новий штам *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries 5 атоксичний, мезофільний, добре росте і спороносить на агаризованих середовищах.

На агаризованому пивному суслі при  $t = -20^{\circ}\text{C}$  колонії розпросторені, бархатисті, спочатку жовтувато-зелені, з віком – оливково-зелені до оливково-коричневих, на звороті – зеленувато-чорні. Гіфи міцелія 1,5–40 мкм товщиною, розгалужені, світлооливкові. Коніюфори до 350 мкм довжиною, 2–6 мкм товщиною, світло-коричневі, гладенькі. Базальні конідії одноклітинні, або з одною перетинкою, до 30 мкм довжиною, 2–5 мкм товщиною світлооливкові, гладенькі. Конідії еліптичні чи лимоноподібні 3–11  $\cdot$  1,8–4,0

мкм, блідооливкові, коричневі, гладенькі, при старінні дрібнобородавчасті в довгих, розгалужених ланцюжках.

Штам добре росте і спороносить на природних (сусловому, картопляно-глюкозному агарі), синтетичних (Чапека, Сабуро, Роме-на-Толла) середовищах.

На більшості досліджених середовищ колонії бархатисті, на картопляно-глюкозному агарі – помітно радіально-складчасті, на агаризованому середовищі Чапека – світліше забарвлені, з білою крайовою зоною 5 мм ширини.

Лінійний ріст колоній на агаризованих середовищах представлений у табл. 1.

Фізіологічна характеристика штаму.

Гриб відноситься до мезофільних мікроміцетів. Оптимальна температура для росту і спороношення  $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ; оптимальне значення активності води  $a_w = 0,98$ ; оптимальна кислотність середовища pH 5–8. Гриб характеризується стійкістю до УФ- та  $\gamma$ -випромінювання. Летальна доза для іонізуючого випромінювання становить ЛД<sub>50</sub> – 5000 Гр.

Єдиним джерелом вуглецю для штама може бути: глюкоза, сахароза, мальтоза, крохмаль; органічні кислоти – лимонна, щавелева; оцтово-кислий натрій.

З джерел азоту засвоює: нітратний, амонійний азот; аспарагінову амінокислоту; сечовину.

Ознаки штаму стійкі.

Штам зберігається в колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України на сусловому і картопляно-глюкозному агарі. Культуру потрібно пересівати 1 раз в рік.

В умовах лабораторного експерименту для гриба вдалося розрахувати баланс вуглецю в середовищі і самому грибі (табл. 2). В результаті було встановлено, що *Cladosporium cladosporioides* практично повністю (75–100%) може будувати себе за рахунок радіоактивного графіту, як єдиного джерела вуглецю в мінеральному живильному середовищі. Таким чином, одержано принципово новий результат, який свідчить про засвоєння неорганічного джерела вуглецю у вигляді  $^{14}\text{C}$  із радіоактивного графіту.

З метою розділення органічного та неорганічного вуглецю в умовах тонкого проростання диспергованого графіту грибними гіфами використана спеціально розроблена у Відділенні радіогеохімії навколишнього середовища Інституту геохімії, мінералогії та рудоутворення НАН України методика термохімічного розділення.

Подрібнена проба грибного міцелію з графітом висушується при  $100^{\circ}\text{C}$  і зважується. В алюмінієвій капсулі, ця проба

поміщається на дно гільзи і засипається шаром кварцевого піску товщиною 5 см. На шар піску насипається суміш  $MnO_2 : CuO$  у співвідношенні 2 : 1 і точно зважена кількість деревного вугілля з відомим вмістом  $^{14}C$ . 5 Графіт нагрівається до температури 400–450°C, а окислювач знаходиться при температурі 700–750°C. При цьому органічні речовини, що складають грибну біомасу підлягають піролізу, а графіт не окислюється. Піролізні гази, проходячи через шар  $MnO_2$  та  $CuO$ , окислюються до діоксиду вуглецю і води та змішуються з  $CO_2$ , одержаним з деревного вугілля. Після закінчення процесу контейнер з графітом та 15

гідролізним залишком точно зважується і по різниці ваги визначається кількість органічної речовини. В отриманому діоксиді вуглецю визначали вміст  $^{14}C$ .

Розроблена методика використана для визначення активності радіовуглецю в 3-ох типах живильних середовищ та міцелії штаму *Cladosporium cladosporioides*, вирощеному на їх основі. Субстратами були середовище Чапека, суміш реакторного та інертного графіту та чистий реакторний графіт. Встановлено, що штам здатний засвоювати радіоактивний графіт як єдине джерело вуглецю в мінеральному живильному середовищі. Результати наведені в табл. 2.

Таблиця 1

Середовище	Дні культивування				
	3	5	7	10	14
Сусло-агар	7 мм	14-16 мм	29-33 мм	35-55 мм	80-90 мм
Картопляно-глюкозний агар	7-8 мм	8-30 мм	32-34 мм	40-50 мм	70-80 мм
Середовище Чапека	4-6 мм	10-12 мм	20-23 мм	25-30 мм	60-70 мм

Таблиця 2

Типи живильних середовищ	Активність $^{14}C$ [Бк/г]
Мінеральне середовище Чапека	0,22
<i>C. cladosporioides</i> на середовищі Чапека	24,1
Суміш реакторного та інертного графіту	2050,0
<i>C. cladosporioides</i> на суміші реакторного та інертного графіту	3700,0
Реакторний графіт	31800,0
<i>C. cladosporioides</i> на реакторному графіті	35900,0

#### Висновки.

1. Штам гриба *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries здатний засвоювати радіоактивний графіт як єдине джерело вуглецю.

2. Штам *Cladosporium cladosporioides* перспективний для прискорення процесів руйнування реакторного графіту та вміщуючих графіт гарячих частинок.

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Куль

Замовлення 4148

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101





УКРАЇНА

(19) UA (11) 14730 (13) C2

(51) 6 C12N1/14, B01D15/06//  
(C12N1/14, C12R1:645)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

## ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ШТАМ ГРИБА CLADOSPORIUM CLADOSPORIODES (FRES.) DE VRIES ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦІЇ РАДІОАКТИВНОГО ГРАФІТУ

(21) 95042142

(22) 27.04.1995

(24) 15.09.2000

(46) 15.09.2000, Бюл. № 4, 2000 р.

(72) Жданова Неллі Миколаївна, Захарченко Вале-  
нтина Олексіївна, Наконечна Лідія Теодорівна, Ве-  
мбер Валерія Володимирівна, Пушкарьов Олек-  
сандр Васильович, Соботович Емлен Володими-  
рович, Ковалюк Микола Миколайович(73) Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. За-  
болотного НАН України(56) 1. Патент США № 3 993 558, МПК<sup>2</sup> В 01 D  
15/06, публ. 23.11.1976.2. Авторське свідоцтво СРСР №1063834, МПК<sup>3</sup> С  
12 N 15/00, публ. 30.12.1983.(57) Штам гриба *Cladosporium cladosporioides*  
(Fres.) de Vries депозитарій Інституту мікробіології і  
вірусології НАН України № 5 для трансформації  
радіоактивного графіту.

Винахід відноситься до галузі мікробіології та радіоекології, а саме до нового штаму мікроскопічного гриба, здатного руйнувати та засвоювати радіоактивний графіт.

Графіт – природна чисто вуглецева речовина із специфічною кристалічною ґраткою. Використовується в реакторах на атомних електростанціях як уповільнювач нейтронів. При цьому він накопичує радіоактивні ізотопи вуглецю, стронцію, цезію, плутонію та ін. Під час аварії на ЧАЕС багато радіоактивного графіту (біля 400 т) було викинуто в навколишнє середовище. Актуальним залишається питання його руйнування і переведення в доступну для рослин форму. Графіт вважається важкодоступним субстратом для мікроорганізмів із-за міцних зв'язків між атомами кристалічної ґратки.

Із літератури відомо, що мікроміцети можуть приймати участь в адсорбції речовин із актиноїдного ряду. Так, гриб *Rhizopus arrhizus* здатний вести адсорбцію у водному розчині торію при концентрації 30-100 мг/л [3]. Той же гриб було використано при адсорбції урану із водного середовища при концентрації останнього 100 мг/л [2]. В основі такого явища лежить фізико-хімічний процес взаємодії іонів важких металів та вище згаданих радіоактивних сполук з активними центрами клітинної оболонки. Останні здебільшого зосереджені у біополімерах, що створюють скелет клітинної оболонки; серед них головне місце належить хітинам, пігментам і в меншій мірі полісахаридам. Процес адсорбції відбувається тільки при наявності конкурентних іонів Cu, Zn, Fe. Хітинова кристалічна ґратка активно приймає участь у цьому процесі при використанні не тільки живої, але й мертвої культури.

На відміну від цього процес трансформації ра-

діоактивного графіту відноситься до більш прогресивної форми. При цьому грибок здатний використовувати радіоактивний графіт, як джерело вуглецю, активно включати його до своїх метаболічних шляхів. Суттєво, що така трансформація включає процеси ресорбції графіту, тобто вона відноситься до незворотних процесів.

У доступній нам літературі ми не знайшли відомості про гриби, які здатні вести себе аналогічно нашому штаму.

Задача винаходу є новий штам гриба, який здатний трансформувати і використовувати радіоактивний графіт в якості єдиного джерела вуглецю.

Задача вирішується використанням штаму *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries 5, який активно росте на середовищі із 100 г/л радіоактивного графіту (активність 2100 Бк), доданому у мінеральне середовище Чапека в якості єдиного джерела вуглецю. Він перспективний для прискорення процесів руйнування реакторного графіту та вміщуючих графіт гарячих частинок.

Новий штам *Cladosporium cladosporioides* виділений та ідентифікований [1] у відділі фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології НАН України. Штам вилучено з уламків радіоактивного графіту, зібраних у 1986 році поблизу четвертого енергоблоку ЧАЕС. Уламки зберігались у водному середовищі, в спеціальному контейнері в Інституті геохімії, мінералогії та рудоутворення НАН України. Штам депонований в Інституті мікробіології та вірусології НАН України під № 5.

Культурно-морфологічні ознаки

Новий штам *Cladosporium cladosporioides*

(19) UA (11) 14730 (13) C2

(Fres) de Vries 5 атоксичний, мезофільний, добре росте і спороносить на агаризованих середовищах

На агаризованому пивному суслі при  $t=20^{\circ}\text{C}$  колонії розпросторені, бархатисті, спочатку жовкувато-зелені, з віком – оливково-зелені до оливково-коричневих, на звороті – зеленувато-чорні. Гіфи міцелю 1,5-40 мкм товщиною, розгалужені, світло оливкові. Коніофори до 350 мкм довжиною, 2-6 мкм товщиною, світло-коричневі, гладенькі. Базальні конідії одноклітинні, або з одною перетинкою, до 30 мкм довжиною, 2-5 мкм товщиною світло оливкові, гладенькі. Конідії еліптичні чи лимоноподібні  $3-11 \times 1,8-4,0$  мкм, блідо оливкові, коричневі,

гладенькі, при старінні дрібно бородавчасті в довгих розгалужених панцюжках

Штам добре росте і спороносить на природних (сусловому, картопляно-глюкозному агарі) синтетичних (Чалека, Сибуро, Ромена-Томе) середовищах

На більшості досліджених середовищ колонії бархатисті, на картопляно-глюкозному агарі – помітно радіально-складчасті, на агаризованому середовищі Чалека – світліше забарвлені, з білою крайовою зоною 5 мм ширини

Лінійний ріст колоній на агаризованих середовищах представлений у таблиці 1

Таблиця 1

Середовище	Дні культивування				
	3	5	7	10	14
Сусл-агар	7 мм	14-16 мм	29-33 мм	35-55 мм	80-90 мм
Картопляно-глюкозний агар	7-8 мм	8-30 мм	32-34 мм	40-50 мм	70-80 мм
Середовище Чалека	4-6 мм	10-12 мм	20-23 мм	25-30 мм	60-70 мм

#### Фізіологічна характеристика штаму

Гриб відноситься до мезофільних мікроміцетів. Оптимальна температура для росту і спороношення  $20-25^{\circ}\text{C}$ , оптимальне значення активності води  $a_w = 0,98$ , оптимальна кислотність середовища pH 5-8. Гриб характеризується стійкістю до УФ- та γ-випромінювання. Летальна доза для іонізуючого випромінювання становить  $\text{LD}_{50} = 5000$  Гр.

Єдиним джерелом вуглецю для штаму може бути глюкоза, сахароза, мальтоза, крохмаль, органічні кислоти – лимонна, щавлева, оцтовокислий натрій.

З джерел азоту засвоює нітратний, амонійний азот, аспарагінову амінокислоту, сечовину.

Ознаки штаму стійкі

Штам зберігається в колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України на суловому і картопляно-глюкозному агарі. Культуру потрібно перевисівати 1 раз в рік.

В умовах лабораторного експерименту для гриба вдалося розрахувати баланс вуглецю в середовищі і самому грибі (табл. 2). В результаті було встановлено, що *Cladosporium cladosporioides* практично повністю (75-100%) може будувати себе за рахунок радіоактивного графіту, як єдиного джерела вуглецю в мінеральному живильному середовищі. Таким чином, одержано принципово новий результат, який свідчить про засвоєння неорганічного джерела вуглецю у вигляді  $^{14}\text{C}$  із радіоактивного графіту.

З метою розділення органічного та неорганічного вуглецю в умовах тонкого проростання диспергованого графіту грибами пфами використана спеціально розроблена у Відділенні радіогеохімії навуко-

льного середовища Інституту геохімії, мінералогії та рудоутворення НАН України методика термічного розділення.

Покріплена проба грибного міцелю з графітом висушується при  $100^{\circ}\text{C}$  і зважується. В алюмінієвій капсулі, ця проба поміщається на дно пльзи і засипається шаром кварцового піску товщиною 5 см. На шар піску насипається суміш  $\text{MnO}_2$   $\text{CuO}$  у співвідношенні 2:1 і точно зважена кількість деревного вугілля з відомим вмістом  $^{14}\text{C}$ . Графіт нагрівається до температури  $400-450^{\circ}\text{C}$ , а окислювач знаходиться при температурі  $700-750^{\circ}\text{C}$ . При цьому органічні речовини, що складають грибну біомасу, підлягають піролізу, а графіт не окислюється. Піролізні газу, проходячи через шар  $\text{MnO}_2$  та  $\text{CuO}$ , окислюються до діоксиду вуглецю і води та змішуються з  $\text{CO}_2$ , одержаним з деревного вугілля. Після закінчення процесу, контейнер з графітом та гідролізім залишком точно зважується і по різниці ваги визначається кількість органічної речовини. В отриманому діоксиді вуглецю визначали вміст  $^{14}\text{C}$ .

Розроблена методика використана для визначення активності радіовуглецю в 3-ох типах живильних середовищ та міцелі штаму *Cladosporium cladosporioides*, вирощеному на їх основі. Субстратами були середовище Чалека, суміш реакторного та інертного графіту та чистий реакторний графіт. Встановлено, що штам здатний засвоювати радіоактивний графіт як єдине джерело вуглецю в мінеральному живильному середовищі. Результати наведені в табл. 2.

Таблиця 2

№ п/п	Типи живильних середовищ	Активність $^{14}\text{C}$ [Бк/г]
1	Мінеральне середовище Чалека	0,22
2	<i>C. cladosporioides</i> № 5 на середовищі Чалека	24,1
3	Суміш реакторного та інертного графіту	2050,0
4	<i>C. cladosporioides</i> № 5 на суміші реакторного та інертного графіту	3700,0
5	Реакторний графіт	31800,0
6	<i>C. cladosporioides</i> № 5 на реакторному графіті	35900,0

Висновки.

1. Штам гриба *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries 5 здатний засвоювати радіоактивний графіт як єдине джерело вуглецю.

2. Штам *Cladosporium cladosporioides* № 5 перспективний для прискорення процесів руйнування реакторного графіту та вміщуючих графіт гарячих частинок.

---

Тираж 50 екз.

Поліграфічний комбінат ВАТ "Патент"  
вул. Гагаріна, 101, м. Ужгород, 88000, Україна  
(03122) 3-72-89 2-59-54

---

-----