



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48901 (13) A

(51) 6 C12N1/26, C12N1/28, C12N1/30

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту(54) ЕВРИТЕРМАЛЬНИЙ ШТАМ МІКРООРГАНІЗМУ *BACILLUS SPECIES* № 205 - ДЕСТРУКТОР ВУГЛЕВОДНІВ, ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН І КСЕНОБІОТИКІВ ТА ЇХ СПОЛУК

1

2

(21) 2002031998
(22) 12 03 2002
(24) 15 08 2002
(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.
(72) Астрова Нелі Геннадівна
(73) Астрова Нелі Геннадівна(57) Евритермальний штам мікроорганізму *Bacillus species* № 205 (*Bacillus species* IMBB - 7044), який використовується для деструкції вуглеводнів, поверхнево-активних речовин і ксенобіотиків в комплексі, в широкому діапазоні температур.

Винахід відноситься до області мікробіології і методів очистки морських і прісних вод від нафти, нафтопродуктів, ПАР і ксенобіотиків.

Відомий штам *Pseudomonas aeruginosa* 123, який застосовується для біологічної очистки води від нафти і нафтопродуктів (А с СРСР №612958, Штам спроможний за 2 доби здійснювати резорбцію нафтової плівки, утилізуючи складові частини нафти та мазута).

Крім того, відомий штам *Pseudomonas fluorescens* 2a №ЦМПБВ-2258, здібний викликати біодеградацію органічних фарбників (А с СРСР №3240133, С12Р 1/39).

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є штам *Pseudomonas putida* 36 №ЦМПБВ – 2443 (А с СРСР №1076446, С12Н 1510011), який є деструктором роду *Pseudomonas*, що використовується для очистки води і ґрунту від нафти і нафтопродуктів.

Недоліком наведених вище штамів є непридатність для їх деструкції вуглеводнів, ПАР і ксенобіотиків в морській воді.

В основу винаходу поставлено задачу розробки евритермального штаму бактерій роду *Bacillus*, який володіє високою деструктивною активністю, здібного здійснювати деструкцію вуглеводнів ПАР і ксенобіотиків в надто мінералізованих середовищах, в тому числі і в морській воді, що дозволить очищати їх з високим ступенем очистки в евритермальних умовах з широким діапазоном температур.

Поставлена задача вирішується тим, що розроблений штам бактерій *Bacillus species* №205, який є деструктором вуглеводородів ПАР і ксенобіотиків та їх сполук.

Одержаний евритермальний штам бактерій

Bacillus species №205 задепонований в Інституті мікробіології і вірусології НАН України ім. Д. К. Заболотного.

Культурально-морфологічні ознаки клітини уявляють собою гр (+), рухомі перитрихальні жгутовання, спороутворюючі палички розміром 1,2х1,4х0,6 – 0,9 мкм. Створюють термостійкі ендоспори розміром 0,5-0,7 мкм. На лептонному агарі (МПА) при температурі +28°C, 48 годинах культивування створюють нижні прозорі колонії, потім стають безколірними, потім кремові, іноді пігмент проникає в субстрат. Створення пігменту відбувається від краю до центру колонії. Колонія гладка, блискуча, край хвилястий.

На м'ясо-пептонному бульйоні (+28°C, 48 годин) створює плівку і муть.

На агаризованому середовищі Кінга створює пігмент шоколадно-коричневого кольору. На синтетичному мінеральному середовищі, на морській воді (+28°C, 48 годин) створює мілкі сіруваті колонії діаметром 1,5 - 2,3 мм. Колонії на твердих агаризованих середовищах не ослизнюються протягом тривалого збереження.

Фізіолого-біохімічні ознаки

Факультативний аероб. Здатний рости при температурі від 10°C до 42,5°C. Оптимум зростання 20-27°C. Зріст на середовищі з NaCl – 5%, 7%, 10% і вище.

Морська сіль – 1,8%, амоній хлористий – 1,0г, калій фосфорнокислий двоосновний – 1,0г, де-стибіотин – 0,001% розчину (або дріжджовий екстракт – 1мл, вода водопровідна – 100мл, рН середовища 7,2-7,5 з добавкою нафти і нафтопродуктів зріст у вигляді рівномірного змутнення).

Відношення до вуглеводородів

Росте на середовищах, які містять нафту, па-

(13) A
(11) 48901
(19) UA

рафін, О-ксіпол, дизельне паливо, мастильне масло Розкладає ксенобіотики, які відносяться до азофарбників і діазофарбників

Стійкість до солей важких металів

Cd-100 μ /мл,

Ug – 25 μ /мл,

Cr⁺³ – 100 μ /мл,

Cr⁺⁶ – 25 μ /мл

Pb від 25 μ /мл до 1000 μ /мл,

Zn – 1000 μ /мл,

Оксилази створює (+),

Каталази створює (+),

Лециталази створює (+),

Желатин розжижує,

Аміак не створює,

Стрчистий водород не створює,

Відношення до Твін 80 – позитивне,

Нітроредуктази не створює

Здібність до утилізації різних вуглеводів

Субстрат Здібність до утилізації цукрів

Глюкоза +^x,

Лактоза+,

Макніт+,

x+ Здібність до утилізації вуглеводів

Відношення до антибіотиків

Чутливий до таких антибіотиків стрептоміцину, гентаміцину, катаміцину, левоміцетину, тетрацикліну, ампіцикліну, ананоміцину, поліміксину

Запропонований штам утилізує в якості джерела живлення нафту, нафтопродукти (дизельне паливо), ксенобіотики (оранжевий діазофарбник Sundizamine Orange GR)

Повне зруйнування вуглеводородів відбувається в морському середовищі при використанні додаткових біогенних стимуляторів, наприклад, дестибіотину, дріжджового екстракту

В аналогічних умовах штам *Bacillus species* №205 здійснює 98-100% деструкцію нафти у концентрації 450 мг/л за 24 години, 98-100% – дизельного палива в концентрації 450 мг/л, 20 діб, 98-

100% – ксенобіотиків в концентрації 300 мг/л за 24 доби і 93-100% – ксенобіотики + нафтопродукти (в комплексі) в концентрації 600 с/л – 36 діб

ПАР – сульфенол в концентрації 001% з додаванням ксенобіотика та бензола - 2,5 с/л за добу

Штам вивільнює від вуглеводородів (нафти, дизельного палива) і ксенобіотиків (оранжевий, діазофарбник – Sunchramim Orang GR) морську воду без введення додаткових видів мікроорганізмів

Приклад 1

Мікробну деструкцію нафти здійснюють наступним чином морську сіль – 1,8%, амоній хлористий – 1,0г, калій фосфорно-кислий двоаміщений – 1,0г, дестибіотин (0,001% розчину) або дріжджовий екстракт – 1мл, вода водопровідна – 1000мл (рН середовища 7,2-7,5) Нафту, використану в якості субстрату для деструкції, вводили в кількості 450мг/л, 350мг/л, 250мг/л, 150мг/л, 100мг/л, 50мг/л і 13500мг/л, рН середовища регулювали 10%-ним NaOH

Деструкцію проводили штамом *Bacillus species* № 205, попередньо культивованим на рибопентонному агарі (РПА) протягом 36 годин при температурі 22°C і двічі відмитим мінеральним середовищем вказаного складу (без вуглеводородів) шляхом центрифугування при 4тис об/хвил протягом 10 хвилин

Для створення оптимальних умов для деструкції вуглеводородів клітинами бактерій, копби у перші 2 години розміщували на гайдалку Наступне культивування здійснювали в стаціонарних умовах при 22°C

Результати деструкції враховували за зникненням нафтової плівки через 24 години, 19 годин, 13 годин, 8 годин, 5,3 годин, 2,6 годин та 33 доби Діапазон культивування (+6 – +22°C)

Результати деструкції нафти наведені у таблиці 1

Таблиця 1

Мікробна деструкція нафти в морській воді eurythermal *Bacillus species* 205 / періодичне культивування (в евритермальних умовах) в діапазоні +6 – +22°C

Субстрат для деструкції	Вміст вуглеводороду (концентрація, с/л)	Час, год	%
1	2	3	4
Нафта (приклад 1)	450	24	98
Нафта (приклад 2)	350	19	99
Нафта (приклад 3)	250	13	100
Нафта (приклад 4)	150	8	100
Нафта (приклад 5)	100	5,3	100
Нафта	50	2,6	100
Нафта	13500	33	100

Приклад 2

Для мікробної деструкції дизельного палива готували штучний розчин морської води вищезазначеного складу

Дизельне паливо в якості субстрата вносили в кількості 450мг/л, 400мг/л, 350мг/л, 300мг/л, 250мг/л, 200мг/л, 150мг/л, 100мг/л, 50мг/л, 25мг/л

і 2275мг/л

Результати деструкції враховували по зникненні в середовищі плівки через 20, 17, 15, 13, 11 діб, 156, 104, 52, 26 годин та 95 діб

Результати деструкції дизельного палива приведені у таблиці 2

Таблиця 2

Мікробна деструкція дизельного палива в морській воді евтермального штаму *Bacillus species* – 205 (періодичне культивування в діапазоні температур +6 – +22°C)

Субстрат для деструкції	Вміст дизельного палива, мг/л	Термін год, тижні	Ефект деструкції, %
1	2	3	4
Дизельне паливо (приклад 1)	450	468-20	98
Дизельне паливо (приклад 2)	400	416-17	99
Дизельне паливо (приклад 3)	350	364-15	100
Дизельне паливо (приклад 4)	300	312-13	100
Дизельне паливо (приклад 5)	250	260-11	100
Дизельне паливо	200	208-9	100
Дизельне паливо	150	156-6	100
Дизельне паливо	100	104	100
Дизельне паливо	50	52	100
Дизельне паливо	25	26	100
Дизельне паливо	2275	95	100

Приклад 3

Мікробну деструкцію ксенобіотика оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) здійснювали методом описаним у прикладі 1. Оранжевий діазофарбник в якості субстрата для деструкції вводили в кількості 300мг/л, 150мг/л, 100мг/л, 50мг/л, 25мг/л і 1075мг/л. Результати деструкції

враховували за зникненням оранжевого діазофарбника в середовищі через 24 доби, 20, 16, 12, 8 діб, 96 годин, 48 годин і 81 добу.

Результати деструкції оранжевого діазофарбника (Sundizamine Orange GR) приведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Мікробна деструкція ксенобіотики в морській воді *Bacillus species* 205 (періодичне культивування) в діапазоні температур +6 – +22°C

Субстрат для деструкції	Вміст ксенобіотика, мг/л	Термін год, доба	Ефект деструкції до ксенобіотиків, %
1	2	3	4
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) (приклад 1)	300	576-24	98
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) (приклад 2)	250	480-20	99
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) (приклад 3)	200	384-16	99
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) (приклад 4)	150	288-12	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) (приклад 5)	100	192-8	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR)	50	96-4	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR)	25	48	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR)	1075	81	100

Приклад 4

Комплексну деструкцію вуглеводнів нафти і ксенобіотика в морській воді здійснюють способом, описаним у прикладі 1. В якості субстрату для деструкції вводили оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо в кількості 600мг/л, 500мг/л, 400мг/л, 300мг/л,

200мг/л, 100мг/л, 50мг/л і 2150мг/л.

Результати деструкції враховували за зникненням оранжевого діазофарбника і плівки у середовищі через 36 діб, 30, 24, 18, 12, 6, 3 діб і 4 місяця.

Результати комплексної деструкції, вуглеводнів нафти (дизельне паливо) і ксенобіотика ора-

нжевого діазофарбника (Sundizamine Orange GR)

приведені в таблиці 4

Таблиця 4

Мікробна деструкція вуглеводородів нафти (дизельне паливо) і ксенобіотика (оранжевого діазофарбника Sundizamine Orange GR) в морському середовищі *Bacillus species* 205 (періодичне культивування, температура культивування +6 – +22°C)

Субстрат для деструкції комплексів (вуглеводороди+ксенобіотики)	Вміст ксенобіотика і вуглеводорода нафти (концентрації), мг/л	Термін доба	Ефект деструкції комплексу (вуглеводород + ксенобіотик), %
1	2	3	4
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо (приклад 1)	300+300=600	36	98
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо (приклад 2)	250+250=500	30	99
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо (приклад 3)	200+200=400	24	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо (приклад 4)	150+150=300	18	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо (приклад 5)	100+100=200	12	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо (приклад)	50+50=100	6	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо (приклад)	25+25=50	3	100
Оранжевий діазофарбник (Sundizamine Orange GR) + дизельне паливо	1075+1075=2150	116=4	100

Приклад 5

Комплексну деструкцію вуглеводнів нафти (бензол) – 50%, ксенобіотика (червоний red c – 6 c s) – 50% і ПАР (сульфонол) – 0,01% проводили у морській воді. Вносили бактеріальну суспензію евритермального штаму *Bacillus species* 205 в кількості 10⁷-10⁸ кл/мл. Кількість субстрату вводили

ли (12,5мг/л (в комплексі), також послідовно в комплекси – 50мг/л, 100мг/л, 150мг/л, 200мг/л, 250мг/л, 300мг/л Сульфонол (ПАР) в кількості – 0,01% додавали в середовище разом з вуглеводородом і ксенобіотиком. Культивування проводили в діапазоні температур 16-22°C

Таблиця 5

Деструкція ксенобіотика (азофарбник червоний red c – 6-c s), вуглевода (бензол) і ПАР 16-22°C (періодичне культивування) евритермальним штамом *Bacillus species* 205

Субстрат для деструкції	Вміст субстрату, мг/л	Термін, год, доба	Ефект деструкції, %
1	2	3	4
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c s) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] приклад 1	12,5+12,5=2,5	24	100
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c s) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] приклад 2	25+25=50	48	100
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c s) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] приклад 3	50+50=100	4	100

Продовження табл 5

1	2	3	4
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c c) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] приклад 4	75+75=150	8	100
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c c) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] приклад 5	100+100=200	8	100
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c c) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] приклад	125+125=250	10	100
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c c) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] приклад	150+150=300	12	100
Ксенобіотик – азофарбник (червоний red c – 6 c c) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%]	1075	44	100

Співставляючи приведені приклади, можна зробити висновок, що запропонований евритермальний штам *Bacillus species* № 205, в порівнянні з прототипом, спроможний викликати максимальну деструкцію нафти зі швидкістю 16,75мг/л за годину, дизельного палива – 24мг/л за годину, ксенобіотика (оранжевого діазофарбника Sundizamine Orange GR) – 13,3мг/л за добу, вуг-

леводорода (дизельне паливо) + ксенобіотика (оранжевий діазофарбник – Sundizamine Orange GR) у комплексі – 18,5мг/л за добу на 96-100% в морській воді при температурі +6 – +22°C, а також ксенобіотика (азофарбник – червоний red c – 6 c c) + бензол+ПАР [(сульфонол) – 0,01%] зі швидкістю 25мг/л речовини за добу на 100% в широкому діапазоні температур 16-22°C

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71