

**Sposób otrzymywania preparatu enzymów wspomagającego bioremediację środowiska zanieczyszczonego węglowodorami ciężkiej frakcji ropy naftowej oraz sposób bioremediacji środowiska zanieczyszczonego ciężką frakcją ropy naftowej**

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu enzymów wspomagającego bioremediację środowisk zanieczyszczonych węglowodorami ciężkiej frakcji P31 ropy naftowej oraz sposób bioremediacji środowiska zanieczyszczonego ciężką frakcją P31 ropy naftowej.

5 Z opisu patentowego PL 166006 jest znany sposób otrzymywania ciekłego kompleksu enzymów celulolitycznych w drodze hodowli szczepu grzyba nitkowatego *Aspergillus niger* IBT-90. Szczep ten przechowywany na skosach agarowych temperaturze 4° C przeszczepia się do sterylnego podłoża inokulacyjnego o pH = 4,8-5,4, zawierającego w procentach wagowych 0,5-1,3 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2-0,4 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,05-0,2 %  
 10  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  oraz wyciągu z otrąb pszennych do 100 %, a nadto 0,5-2 % glukozy, a następnie hoduje w czasie 36-65 godzin w temperaturze 28-30° C na wstrząsarce, po czym otrzymane inokulum przeszczepia się na podłoże hodowlane o składzie w procentach wagowych 0,5-1,3 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2-0,4 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,05-0,2 %  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  oraz do 100 % wyciągu z otrąb pszennych,  
 15 zawierające nadto 4,8-5,8 % pyłu bawełnianego i 2-3 % kielków słodowych i poddaje hodowli powierzchniowej w temperaturze 28-30° C w czasie 8-14 dni.

Z opisu patentowego PL 209161 jest znany sposób otrzymywania kompleksu enzymów w drodze hodowli szczepu grzyba nitkowatego *Aspergillus niger* IBT-90, polegający na tym, że ze szczepu przygotowuje się materiał posiewowy na podłożu  
 20 stałym lub ciekłym i materiałem tym szczepi się ciekłe podłoże produkcyjne o składzie w częściach wagowych: 50-120 części kielków słodowych, 20-80 części pektyny jabłkowej i ewentualnie wytlóków jabłkowych, ewentualnie 10-40 części pyłu bawełnianego, ewentualnie 10-50 części wysłodków buraczanych, 5-50 części celulozy mikrokrystalicznej lub otrąb pszennych i/lub odpadów przemysłu owocowo-  
 25 warzywnego zawierających celulozę i pektynę oraz 1000 części wody wodociągowej zawierającej substancje mineralne i prowadzi hodowlę produkcyjną wgłębną w temperaturze 25-30° C w czasie 80-150 godzin w obecności emulsji silikonowej doprowadzając do fermentora powietrze i mieszając zawartość fermentora. Materiał

posiewowy szczepu otrzymuje się w drodze uaktywnienia szczepu na podłożu stałym zawierającym brzeczkę słodową lub ekstrakt słodowy oraz agar, w temperaturze 10-40° C czasie 3-8 dni lub na podłożu ciekłym zawierającym kielki słodowe pektynę jabłkową i ewentualnie wytloki jabłkowe, ewentualnie pył bawełniany, ewentualnie wysłodki buraczane, celulozę mikrokrystaliczną lub otręby pszenne i/lub odpady przemysłu owocowo-warzywnego zawierające celulozę i pektynę oraz wodę wodociągową zawierającą składniki mineralne i prowadząc hodowlę wglębną w obecności emulsji silikonowej w temperaturze 25-30° C w czasie 24 godzin doprowadzając do fermentora powietrze i mieszając zawartość fermentora.

10 Natomiast z opisu patentowego PL 209163 znany jest sposób otrzymywania kompleksu enzymów w drodze hodowli szczepu grzyba *Aspergillus niger* IBT-90 na podłożu produkcyjnym zawierającym wysłodki buraczane, otręby pszenne, kielki słodowe, pektynę jabłkową, ewentualnie skórki z pomidorów oraz wodę wodociągową zawierającą składniki mineralne, w temperaturze pokojowej w czasie 1-8 dni. Szczep 15 grzyba uaktywnia się na podłożu stałym zawierającym brzeczkę słodową lub ekstrakt słodowy oraz agar w temperaturze 10-40° C w czasie 3-8 dni.

Z opisu zgłoszenia patentowego P. 398611 jest znana hodowla szczepu grzyba *Aspergillus niger* IBT-90 na podłożu produkcyjnym stałym zawierającym wysłodki buraczane, otręby pszenne, kielki słodowe, ewentualnie skórki z pomidorów lub odpady 20 cytrusowe, ewentualnie pektynę jabłkową, a nadto wodę wodociągową zawierającą rozpuszczone składniki mineralne, jak diwodorofosforan (V) potasu, siarczan (VI) magnezu, chlorek wapnia, siarczan (VI) żelaza (II), siarczan (VI) kobaltu, siarczan (VI) manganu, siarczan (VI) cynku, siarczan (VI) miedzi oraz mocznik, prowadzonej w temperaturze 28° C w czasie 120 godzin w obecności emulsji silikonowej przy 25 doprowadzaniu do fermentora sterylne go powietrze.

Znane jest wykorzystanie szczepów bakterii do bioremediacji środowiska zanieczyszczonego węglowodorami ropopochodnymi.

I tak w czasopiśmie *Journal of Hazardous Materials* 2010 r., t. 176, s. 27-34 opisano wykorzystanie szczepów bakterii *Acinetobacter sp.* i *Pseudomonas* oraz konsorcjum 30 szczepów *Gordonia alkanivorans* i *Rhodococcus erythropolis* do biodegradacji ogólnej puli węglowodorów ropy naftowej.

W opisie patentowym PL 206565 ujawniono sposób otrzymywania biopreparatu do degradacji węglowodorów cięższych frakcji ropy naftowej, polegający na wyselekcjonowaniu ze środowiska skażonego szczepów bakterii *Gordonia alkanivorans* S7, *Pseudomonas fluorescens* SI-3 i *Bacillus subtilis* P-31.2, które namnaża się

5 w formie mieszaniny na pożywce zawierającej glukozę lub sacharozę, azotan lub siarczan amonu, wodorofosforan sodu, substancje wzrostowe oraz dodatek węglowodorów cięższych frakcji ropy naftowej, w warunkach tlenowych.

Natomiast w opisie patentowym PL 206566 ujawniono sposób otrzymywania biopreparatu do degradacji węglowodorów oleju napędowego, polegający na

10 wyselekcjonowaniu ze środowiska skażonego szczepów bakterii *Gordonia alkanivorans* S7, *Micrococcus luteus* A.32.1 i *Pseudomonas circulans* Bp i namnożeniu tych szczepów na pożywce w warunkach tlenowych.

W czasopiśmie *Bioresource Technology* 2003 r., t. 87, s. 81–86 opisano wykorzystanie *Aspergillus niger* ATCC 9642 do degradacji hexdekanu w procesie *solid*

15 *state*.

Z czasopisma *Marine Pollution Bulletin* 2007 r., t. 54, s. 1692-1696 jest znane wykorzystanie *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium chrysogenum* do degradacji n-alkanów z piasków otrzymanych z plaż Al-Qurum, AL-Hail, Al-Sawadi.

W czasopiśmie *International Biodeterioration & Biodegradation* 2011 r., t. 65,

20 s. 649-655 ujawniono wykorzystanie *Penicillium chermesinum*, *Penicillium indicum* i *Aspergillus terreus* w oczyszczaniu gleby pobranej z pola bioremediacyjnego.

W procesach bioremediacji gleby jak również środowiska płynnego zanieczyszczonego substancjami ropopochodnymi fundamentalnym problemem jest rozkład trudno degradowalnych związków. Transformacji tych zanieczyszczeń

25 w związki łatwiej przyswajalne przez mikroorganizmy może sprzyjać obecność niektórych enzymów z klasy oksydoreduktaz, na przykład lakkazy i peroksydazy oraz enzymów z klasy hydrolaz.

Znane są sposoby wspomaganie procesów bioremediacji środowisk zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi za pomocą enzymów otrzymanych

30 w hodowli grzybów nitkowatych.

W zgłoszeniu patentowym P-399980 opisano wykorzystanie preparatu enzymów

*Mucor circinelloides* UD254 do wspomagania bioremediacji gruntów zanieczyszczonych olejem napędowym, za pomocą pojedynczego szczepu lub konsorcjum szczepów bakterii o zdolności degradacji węglowodorów.

W kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej znajduje się  
5 szczep grzyba nitkowatego *Aspergillus niger* oznaczony symbolem IBT-150 wyizolowany ze środowiska naturalnego oraz szczepy bakterii *Achromobacter xylosoxidans* oznaczony symbolem G21 i *Bacillus mycoides* oznaczony symbolem NS1020.

Sposób otrzymywania preparatu enzymów wspomagających bioremediację  
10 środowisk zanieczyszczonych ciężką frakcją P31 ropy naftowej, w drodze hodowli szczepu grzyba nitkowatego *Aspergillus niger*, polegający na uaktywnieniu szczepu przechowywanego na stałym podłożu zawierającym brzeczkę piwowarską o stężeniu 6-10° Błg w ilości 1000 części wagowych, agar w ilości 3 % wagowych, w temperaturze 29-31° C w czasie 48 godzin, następnie zmyciu wyhodowanych zarodników solą fizjologiczną z dodatkiem środka powierzchniowo czynnego o stężeniu 80 % dodanego  
15 w ilości 4-6 % v/v, zaszczepieniu otrzymanym inokulum, użytym w ilości 2 % v/v, wysterylizowanego ciekłego podłoża hodowlanego i prowadzeniu hodowli produkcyjnej w temperaturze 29-31° C na wytrząsarce przy szybkości 200 obrotów/min, a następnie odsączeniu otrzymanej biomasy, przemyciu jej wodą destylowaną,  
20 odwodnieniu acetonem, suszeniu w temperaturze 25° C i mechanicznym rozdrobieniu do wielkości drobin 5-10 µm, **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że stosuje się szczep grzyba nitkowatego *Aspergillus niger* IBT-150, który uaktywnia się na podłożu stałym zawierającym dodatkowo ciężką frakcję P31 ropy naftowej w ilości 0,001 % w/w, o pH 7, przy czym proces uaktywniania prowadzi się co najmniej 3-krotnie, zaś  
25 hodowlę produkcyjną prowadzi się na podłożu hodowlanym zawierającym ekstrakt z otrębów pszennych, chlorek wapnia, siarczan żelaza, siarczan manganu, siarczan cynku, siarczan magnezu, siarczan sodu, chlorek kobaltu, diwodorofosforan potasu, o pH 4,5 w czasie 96 -120 godzin.

Sposób bioremediacji gleby zanieczyszczonej ciężką frakcją P31 ropy naftowej,  
30 polegający na przygotowaniu inokulum pojedynczego szczepu lub konsorcjum szczepów bakterii o właściwościach degradacji węglowodorów, jak *Achromobacter*

*xylosoxidans* G21 oraz *Bacillus mycoides* NS1020, w drodze hodowli wstrząsanej na wysterylizowanym podłożu płynnym zawierającym przyswajalne źródło węgla, azotu, fosforu oraz substancje wzrostowe, następnie wprowadzeniu namnożonego inokulum do oczyszczanej gleby i prowadzeniu hodowli w warunkach tlenowych, w temperaturze 5 25-30° C w czasie 35-60 dni przy wilgotności 25-40 %, w trakcie której do oczyszczanego środowiska wprowadza się zawieszony w sterylnej wodzie preparat enzymów i po wprowadzeniu tego preparatu kontynuuje się proces bioremediacji, **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że stosuje się preparat enzymów *Aspergillus niger* IBT-150 otrzymany opisanym wyżej sposobem, który wprowadza się 10 w okresie między 12-16 dniem bioremediacji stosując 1-2 g preparatu na 1,5 kg substancji ropopochodnych zawartych w oczyszczanej glebie.

Natomiast sposób bioremediacji środowiska wodnego zanieczyszczonego ciężką frakcją P31 ropy naftowej, polegający na przygotowaniu inokulum pojedynczego szczepu lub konsorcjum szczepów bakterii o właściwościach degradacji 15 węglowodorów, jak *Achromobacter xylosoxidans* G21 oraz *Bacillus mycoides* NS1020, w drodze hodowli wstrząsanej na wysterylizowanym podłożu płynnym zawierającym przyswajalne źródło węgla, azotu, fosforu oraz substancje wzrostowe, następnie wprowadzeniu namnożonego inokulum do oczyszczanej gleby i prowadzeniu hodowli w warunkach tlenowych, w temperaturze 25-30° C w czasie 14 dni, w trakcie której do 20 oczyszczanego środowiska wprowadza się zawieszony w sterylnej wodzie preparat enzymów i po wprowadzeniu tego preparatu kontynuuje się proces bioremediacji **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że stosuje się preparat enzymów *Aspergillus niger* IBT-150 otrzymany opisanym wyżej sposobem, który wprowadza się w okresie między 7-10 dniem bioremediacji stosując 1-2 g preparatu na 1,5 kg 25 substancji ropopochodnych zawartych w oczyszczanym środowisku.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład I.

Szczep pleśni *Aspergillus niger* IBT- 150 wyodrębniony ze środowiska naturalnego przeszczepiono na aktywujące podłoże stałe, wysterylizowane w temperaturze 121° C 30 w czasie 20 minut, o składzie w częściach wagowych: 0,001 część ciężkiej frakcji P31 ropy naftowej, 30 części agaru, 1000 części brzezki piwowarskiej o stężeniu 10°Blg,

o pH 7 i prowadzono hodowlę uaktywniającą na tym podłożu w temperaturze 29° C w czasie 48 godzin, po czym przeszczepiano na podłoże hodowlane o analogicznym składzie i prowadzono kolejną hodowlę uaktywniającą. Procedurę kolejnych hodowli uaktywniających powtarzano 3-krotnie. Kolonie wyrosłe po 3-iej hodowli zalano 10 ml soli fizjologicznej z dodatkiem Tween'u o stężeniu 80 % w ilości 4 % v/v, zmyto 5 grzybnię z powierzchni skosu eża, po czym otrzymaną zawiesiną, użytą w ilości 2 % v/v szczepiono aktywujące podłoże ciekłe, wysterylizowane w temperaturze 121° C w czasie 20 minut, o składzie w częściach wagowych: 50 części otrąb pszennych, 10 części KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 części NaNO<sub>3</sub>, 0,3 części MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 15 części CaCl<sub>2</sub>, 0,05 10 części FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,00156 części MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,0014 części ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,00336 części CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 1000 części woda wodociągowa, o pH skorygowanym do wartości 4,5. Prowadzono hodowlę wstrząsaną przez 120 godzin w temperaturze 29° C na wytrząsarce mimośrodowej o amplitudzie drgań 4,5 cm przy szybkości 200 min<sup>-1</sup>. Uzyskaną w wyniku hodowli biomasę, po odsączeniu na lejku Buchnera 3-krotnie 15 odwadniano acetonem stosując 15 cm<sup>3</sup> acetonu o temperaturze 4° C na 1 g odsączonej biomasy, suszono 18 godzin w temperaturze 20° C i rozdrobiono w młynie udarowym do wielkości ziaren 5-10 µm.

Jednocześnie przygotowano inokulum szczepu *Achromobacter xylosoxidans* G21 w drodze hodowli wstrząsanej na, wysterylizowanym w temperaturze 121° C w czasie 20 20 minut, podłożu płynnym o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 20 części ekstraktu drożdżowego, 15 części Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 części NH<sub>4</sub>Cl, 1000 części wody wodociągowej, o pH 6,5 w czasie 48 godzin.

Do kuwety o objętości 1000 cm<sup>3</sup>, zawierającej 0,50 kg gleby skażonej frakcją P-31 w ilości 4 % w/w dodawano 48-godzinne kultury bakterii z hodowli płynnej w ilości 40 25 cm<sup>3</sup> na 1 kg gleby, mieszając próby co 2 dni. Po upływie 12 dni do kuwety dodano stały preparat enzymatyczny *Aspergillus niger* IBT-150 w proporcji 1 g na 1,5 kg substancji ropopochodnych zawartych w oczyszczanej glebie. Bioremediację prowadzono przez okres 60 dni, utrzymując wilgotność gleby na poziomie 25 %.

Stwierdzono 55%-owy ubytek ogólnej puli węglowodorów tj. o 15 % większy niż 30 w przypadku bioremediacji prób gleby prowadzonej wyłącznie z udziałem bakterii, bez dodatku stałego preparatu enzymatycznego z *Aspergillus niger* IBT-150.

### Przykład II.

Procedurę aktywowania szczepu pleśni *Aspergillus niger* IBT- 150 wyodrębnionego ze środowiska naturalnego prowadzono jak w przykładzie I.

Wyrośnięte kolonie zalano 10 ml soli fizjologicznej z dodatkiem 4 % v/v Tween'u stężeniu 80 % i zmyto grzybnię z powierzchni skosu ezą. 2 % v/v otrzymanej zawiesiny szczepiono aktywujące podłoże ciekłe, wysterylizowane w temperaturze 121° C w czasie 20 minut, o składzie w częściach wagowych: 40 części otrąb pszennych, 10 części KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 części NaNO<sub>3</sub>, 0,3 części MgSO<sub>4</sub> x7 H<sub>2</sub>O, 15 części CaCl<sub>2</sub>, 0,05 części FeSO<sub>4</sub> x7 H<sub>2</sub>O, 0,00156 części MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,0014 części ZnSO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O, 0,00336 części CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 1000 części wody wodociągowej, którego pH skorygowano do wartości 4,5 i prowadzono hodowlę wstrząsaną przez 96 godzin w temperaturze 31° C na wytrząsarce mimośrodowej o amplitudzie drgań 4,5 cm przy szybkości 200 min<sup>-1</sup>. Uzyskaną w wyniku hodowli biomasę, po odsączeniu na lejku Büchnera, 3-krotnie odwadniano acetonem stosując 15 cm<sup>3</sup> acetonu o temperaturze 4° C na 1 g odsączonej biomasy, suszono 18 godzin w temperaturze 20° C i rozdrobiono w młynie udarowym do wielkości ziaren 5-10 µm.

Jednocześnie przygotowano inokulum konsorcjum szczepów *Achromobacter xylosoxidans* G21 oraz *Bacillus mycoides* NS1020 w drodze hodowli wstrząsanej na, wysterylizowanym w temperaturze 121° C i w czasie 20 minut, podłożu płynnym o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 20 części ekstraktu drożdżowego, 15 części Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 części NH<sub>4</sub>Cl, 1000 części wody wodociągowej, o pH 6,5 w czasie 48 godzin.

Do kuwety o objętości 1000 cm<sup>3</sup>, zawierającej 0,50 kg gleby skażonej frakcją P-31 w ilości 4 % w/w, dodano 48-godzinne kultury bakterii z hodowli płynnej stosując 40 cm<sup>3</sup> na 1 kg gleby, mieszając próby co 2 dni. Po upływie 16 dni do kuwety dodawano stały preparat enzymatyczny *Aspergillus niger* IBT-150 w proporcji 2 g na 1,5 kg substancji ropopochodnych zawartych w oczyszczanej glebie. Bioremediację prowadzono przez 35 dni, utrzymując wilgotność gleby na poziomie 40 %.

Po okresie bioremediacji stwierdzono 60 %-owy ubytek ogólnej puli węglowodorów tj. o 20 % większy niż w przypadku bioremediacji prób gleby prowadzonej wyłącznie z udziałem bakterii, bez dodatku preparatu enzymatycznego z *Aspergillus niger*

IBT-150.

Przykład III.

Szczep pleśni *Aspergillus niger* IBT- 150 wyodrębniony ze środowiska naturalnego uaktywniano na podłożu stałym jak w przykładzie I.

- 5 Wyrosłe kolonie zalano 10 ml soli fizjologicznej z dodatkiem 6% v/v Tween'u o stężeniu 80 % i zmyto grzybnię z powierzchni skosu ezą. Otrzymaną zawiesiną, użytą w ilości 2 % v/v, szczepiono podłoże ciekłe, wysterylizowane w temperaturze 121° C w czasie 20 minut, o składzie w częściach wagowych: 50 części otrąb pszennych, 10 części KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 części NaNO<sub>3</sub>, 0,3 części MgSO<sub>4</sub> x7 H<sub>2</sub>O, 15 części CaCl<sub>2</sub>, 0,05
- 10 części FeSO<sub>4</sub> x7 H<sub>2</sub>O, 0,00156 części MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,0014 części ZnSO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O, 0,00336 części CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 1000 części wody wodociągowej, którego pH korygowano do wartości 4,5 i prowadzono hodowlę wstrząsaną przez 120 godzin w temperaturze 31° C na wytrząsarce mimośrodowej o amplitudzie drgań 4,5 cm przy
- 15 szybkości 200 obrotów /min. Uzyskaną w wyniku hodowli biomasę, po odsączeniu na lejku Büchnera, 3-krotnie odwadniano acetonem stosując 15 cm<sup>3</sup> acetonu o temperaturze 4° C na 1 g odsączonej biomasy, suszono 18 godzin w temperaturze 20 ° C i rozdrobiono w młynie udarowym do wielkości ziaren 5-10 µm.
- Jednocześnie przygotowano inokulum szczepu *Bacillus mycoides* NS1020 w drodze hodowli wstrząsanej na wysterylizowanym, w temperaturze 121° C w czasie 20 minut,
- 20 podłożu płynnym o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 20 części ekstraktu drożdżowego, 15 części Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 części NH<sub>4</sub>Cl, 1000 części wody wodociągowej, o pH 6,5 w czasie 48 godzin.
- Do kolby o pojemności 1 l zawierającej 100 ml wody wodociągowej dodano: 4 g ciężkiej frakcji P31 ropy naftowej, 2 g glukozy, 2 g ekstraktu drożdżowego, 1,5 g
- 25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g NH<sub>4</sub>Cl i sterylizowano w temperaturze 121° C przez 20 minut, po czym szczepiono *Achromobacter xylosoxidans* G21 oraz *Bacillus mycoides* NS1020. Hodowlę prowadzono w temperaturze 25° C na wstrząsarce mimośrodowej o amplitudzie drgań 4,5 cm przy szybkości obrotów 200 min<sup>-1</sup>. Po 7 dniach dodano stały preparat *Aspergillus niger* IBT- 150 w proporcji 1 g na 1 kg związków ropopochodnych.
- 30 Po 14 dniach prowadzenia procesu stwierdzono 80 %-owy ubytek ogólnej puli węglowodorów tj. o 10 % większy niż w przypadku prowadzenia próby bioremediacji

wyłącznie z udziałem bakterii, bez dodatku preparatu enzymatycznego z *Aspergillus niger* IBT- 150.

#### Przykład IV.

Szczep pleśni *Aspergillus niger* IBT- 150 wyodrębniony ze środowiska naturalnego  
5 aktywowano na podłożu stałym jak w przykładzie I.

Wyrosłe kolonie zalano 10 ml soli fizjologicznej z dodatkiem 6 % v/v Tween'u  
o stężeniu 80 % i zmyto grzybnię z powierzchni skosu eżą, Otrzymaną zawiesiną, użytą  
w ilości 2 % v/v szczepiono podłoże ciekłe, wysterylizowane w temperaturze 121°C  
w czasie 20 minut, o składzie w częściach wagowych: 40 części otrąb pszennych, 10  
10 części  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 13 części  $\text{NaNO}_3$ , 0,3 części  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 15 części  $\text{CaCl}_2$ , 0,05  
części  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,00156 części  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,0014 części  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  
0,00336 części  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 1000 części wody wodociągowej, którego pH  
korygowano do wartości 4,5. Hodowlę wstrząsaną prowadzono przez 90 godzin  
w temperaturze 30° C na wytrząsarce mimośrodowej o amplitudzie drgań 4,5 cm przy  
15 szybkości 200 min<sup>-1</sup>. Uzyskaną w wyniku hodowli biomasę, po odsączeniu na lejku  
Büchnera, 3-krotnie odwadniano acetonem stosując 15 cm<sup>3</sup> acetonu o temperaturze 4° C  
na 1 g odsączonej biomasy, suszono 18 godzin w temperaturze 20° C i rozdrobiono  
w młynie udarowym do wielkości ziaren 5-10 µm.

Jednocześnie przygotowano inokulum konsorcjum szczepów *Achromobacter*  
20 *xylooxidans* G21 oraz *Bacillus mycoides* NS1020 w drodze hodowli wstrząsanej na,  
wysterylizowanym w temperaturze 121°C w czasie 20 minut, podłożu płynnym  
o składzie w częściach wagowych: 20 części glukozy, 20 części ekstraktu drożdżowego,  
15 części  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 części  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1000 części wody wodociągowej, o pH 6,5  
w czasie 48 godzin.

25 Do kolby o pojemności 1 l zawierającej 100 ml wody wodociągowej dodawano: 4 g  
ciężkiej frakcji P31 ropy naftowej, 2 g glukozy, 2 g ekstraktu drożdżowego, 1,5 g  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  i sterylizowano w temperaturze 121° C przez 20 minut, po czym  
szczepiono *Achromobacter xylooxidans* G21 oraz *Bacillus mycoides* NS1020. Hodowlę  
prowadzono w temperaturze 30° C na wstrząsarce mimośrodowej o amplitudzie drgań  
30 4,5 cm przy szybkości obrotów 200 obrotów/min. Po 10 dniach dodano stały preparat  
*Aspergillus niger* IBT- 150 w proporcji 2 g na 1 kg związków ropopochodnych.

- 10 -

Po 14 dniach prowadzenia procesu stwierdzono 90 %-owy ubytek ogólnej puli węglowodorów tj. o 20 % większy niż w przypadku prowadzenia prób bioremediacji wyłącznie z udziałem bakterii, bez dodatku preparatu enzymatycznego z *Aspergillus niger* IBT- 150.

RZECZNIK PATENTOWY

  
mgr inż. Ewa Kaczur-Kaczyńska