



(10) **LT 5579 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5579** (51) Int. Cl. (2006): **B09C 1/10**

(21) Paraiškos numeris: **2008 070**

(22) Paraiškos padavimo data: **2008 09 15**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2009 03 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2009 06 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:

Rapolas LIUŽINAS, LT
Karolis JANKEVIČIUS, LT
Mečislovas KMITA, LT
Dalia Zita ZVEROČKINIENĖ, LT
Lilija KALĖDIENĖ, LT
Gražina GIEDRAITYTĖ, LT

(73) Patent savininkas:

VšĮ „Grunto valymo technologijos“, Antakalnio g. 42, LT-10304 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Genė Ona SRUOGIENĖ, A.P.Kavoliuko g. 24-152, LT-04328 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Grunto, užteršto nafta arba jos produktais, biologinio valymo būdas

(57) Referatas:

Išradimas priklauso biotechnologijos ir aplinkos apsaugos sričiai ir tinka naudoti grunto, užteršto nafta ir naftos produktais, biologiniam valymui *ex situ* arba *in situ* sąlygomis. Valymas atliekamas tokiu būdu: į užterštą gruntą įterpia mineralinių trąšų, užterštą gruntą įdirba periodiškai jį kultivuojant, taip pat homogenizuojant ir aeruojant, užterštą gruntą drėkina, o pradinėje jo valymo stadijoje į jį tolygiai įterpia induočių augalų - žieminių rugių (*Secale cereale*) susmulkintos žaliosios biomasės kaip naftos produktus skaidančių fermentų (oksidazių, katalazių, peroksidazių) ir kitų fiziologiškai aktyvių junginių šaltinį.

Išradimas priklauso biotechnologijos ir aplinkos apsaugos sritims ir tinka naudoti grunto, užteršto nafta arba jos produktais, pavyzdžiui, mazutu, biologiniam valymui *ex situ* arba *in situ* sąlygomis.

Žinoma, kad padidėjus grunto ir dirvožemio taršai naftos produktais, jų valymui imta naudoti naftą oksiduojančius mikroorganizmus (NOM), kuriamos bei tobulinamos aplinkos biovalymo technologijos, naudojančios NOM.

Pastaraisiais metais ieškoma naujų būdų gruntui, užterštam sunkiaisiais metalais, pesticidais, nafta ir jos produktais, apvalyti, vis labiau domimasi galimybe panaudoti aukštesnius induočius augalus, jų šaknų sistemą. Augalų panaudojimas įvairios kilmės teršalų mažinimui ar jų pilnutiniam nukenksminimui substrate vadinamas fitoremediacija. Fitoremediacijai naudojamos įvairios augalų rūšys, priklausančios mediniams, žoliniams varpiniams, ankštiniais (pupiniams) augalams. Šie augalai turi gerai išvystytą šaknų bei šakniastiebių sistemą. Jie greitai išplinta užterštame plote iš neužterštos zonos. Ant naftos produktams, priklausomai nuo koncentracijos, atsparių augalų šaknų ir šakniaplaukių – augalų rizosferoje kaupiasi keliasdešimt kartų daugiau mikroorganizmų, palyginti su toliau nuo šaknų ar šakniastiebių esančiu gruntu. Augalų šaknys pasižymi gerai išreikštu ekstraceliuliariniu proteolitiniu aktyvumu. Dėl to mikroorganizmams sunkiai prieinamas organinių junginių azotas tampa lengvai įsisavinamu. Augalų šaknys pasižymi fosfataziniu aktyvumu. Jis pagerina grunto organofosfatų ir į gruntą įterpiamų superfosfato trąšų transformaciją. Fosforas tampa geriau prieinamas įvairiems grunto fiziologinių grupių bei naftą oksiduojantiems mikroorganizmams.

Induočiai augalai ne tik įsisavina grunto bei dirvožemio tirpalo laisvuosius, o taip pat koloidų sorbuotus jonus (katijonus ir anijonus), bet išskiria į aplinką įvairius organinius junginius (dalis jų sudaro fiziologiškai aktyvius junginius), kurie, kaip maisto šaltinis mikroorganizmams, užtikrina spartų jų dauginimąsi (Sud. K. Jankevičius ir R. Liužinas. Aplinkos biologinis valymas, 2003). Teršalų įsiurbimas per augalų šaknis ir jų nukenksminimas vis plačiau ir išsamiau tiriamas. Buvo parodyta, kad augalų šaknų sistemos

peroksidazės *in vitro* dalyvauja fenolių junginių polimerizacijoje, kuriuos pašalina iš tirpalų (Alder, P. R. ir kt., Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. J. of Environment Quality, 1994).

Daugiažiedžiai aromatiniai angliavandeniliai yra hidrofobiški junginiai. Augalai juos įsiurbia silpnai. Tokiu būdu daugelis augalų tiesiogiai kai kurių teršalų skaidyme nedalyvauja. Jie savo šaknų eksudatais gerina rizosferos mikroorganizmų augimą ir taip dalyvauja teršalų kooksidacijoje (Kamath R. J. ir kt. Effects of plant-derived substrates on expression of catabolic genes using a nah-lux reporter. Environmental Science and Technology, 2004).

Daugelis augalų rūšių rizosferoje sudaro mikrobines cenozes, kurios pasižymi gerai išreikštu degradaciniu potencialu. Išsamiai išnagrinėtas *Medicago sativa*, *Phragmites australis*, *Sorghum sudanense*, *Festuca arundinacea*, *Oryza sativa*, *Panicum virgatum* rizosferos vaidmuo skaidant poliaromatinčius angliavandenilius (Muratova A. ir kt. International Journal of Phytoremediation, vol 5(2), 2003; Ho C. H. ir kt., International Journal of Phytoremediation, vol 9(2), 2007).

Aukščiau paminėtų darbų ir daugelio kitų panašaus pobūdžio darbų trūkumas yra tai, kad jie yra laboratorinių tyrimų stadijoje ir nėra pritaikyti aplinkos biovalymui. Kol kas tik pavieniai tyrimai yra panaudojami praktikos reikalam – naftos ir jos produktų skaidymui, be to aukščiau minėti būdai nėra efektyvūs, kai grunto užterštumas nafta arba jos produktais yra labai didelis ir siekia 30 000 mg/kg sauso grunto ir daugiau.

Artimiausias žinomas nafta užteršto grunto biovalymo būdas pateiktas LT 4593 B patento aprašyme, kai esant grunto užterštumo naftos produktais koncentracijai ne didesnei kaip 6 000-7 000 mg/kg sauso grunto, į gruntą įsėja naftos užterštumui tolerantiškas aukštesniųjų augalų (induočių) – žemės ūkio kultūrų sėklas, išaugina augalus ir jų rizosferą panaudoja grunto biovalymui.

Šio iš esmės pozityvaus būdo trūkumas yra tas, kad jo praktinio panaudojimo galimybės yra ribotos. Naftos produktai yra toksiški. Augalų sėklos, idant jos sudygtų, įsėjamos tik tuo metu, kai naftos produktų koncentracija valomajame grunte sumažėja iki 6-7 g/kg. Tuo tarpu gruntas biovalymui paruošiamas, kai jo naftinė tarša yra didelė ir siekia apie 30 000 mg/kg grunto.

Išradimo uždavinys – pagerinti grunto, užteršto naftos angliavandeniliais, valymo efektyvumą esant grunto užterštumo naftos produktais didelei koncentracijai, siekiančiai 29 000-30 000 mg/kg sauso grunto, kartu atpiginti šį procesą naudojant nebrangią vietinių žemės ūkio kultūrų biomasę, padedančią intensyvuoti svarbių naftą skaidančių mikroorganizmų veiklą ir aktyviai – degraduojančiai veikiančiai naftos angliavandenilius.

Uždavinys išsprendžiamas tuo, kad gruntą, užterštą nafta arba jos produktais, biologinę valymą vykdo tokiu būdu: į užterštą gruntą įterpia mineralinių trąšų, užterštą gruntą įdirba, homogenizuoja ir aeruoja jį periodiškai kultivuojant, užterštą gruntą drėkina, kai grunto užterštumo naftos produktais koncentracija yra didelė, siekianti 29 000-30 000 mg/kg sauso grunto, į gruntą pradinėje jo valymo stadijoje įdeda fermentų (oksidazių, katalazių, peroksidazių), svarbių naftą skaidančių mikroorganizmų veiklai intensyvuoti bei gebančių savarankiškai skaidyti naftos angliavandenilius.

Fermentų (oksidazių, katalazių, peroksidazių), gebančių savarankiškai skaidyti naftos angliavandenilius, šaltiniu naudoja induočių augalų - žemės ūkio kultūrų susmulkintą žaliąją biomasę.

Induočių augalų – žemės ūkio kultūrų susmulkinta žaliaji biomasė pasižymi tuo, kad jos sudėtyje yra naftos produktus oksiduojančių fermentų ir kitų fiziologiškai aktyvių junginių, svarbių naftą skaidančių mikroorganizmų veiklai intensyvuoti.

Grunto, užteršto nafta arba jos produktais, biologiniam valymui naudoja iš induočių augalų - žemės ūkio kultūrų parinktus žieminius rugius (*Secale cereale*), kurių žaliąją biomasę gamina žieminių rugių augalus smulkinant, kol minėtų augalų kapojai siekia nuo maždaug 1,5 iki maždaug 3,5 cm ilgio bei išsiskiria augalinės masės skystasis turinys.

Taip paruošta augalinė masė įterpiama į užterštą gruntą geriau jame pasiskirsto, o esantys augalų kapojai padaro gruntą puresnį ir sudaro sąlygas įsiskverbti deguoniui į gilesnius grunto sluoksnius, kur skystojo turinio fermentai tiesiogiai oksiduoja naftos angliavandenilius.

Žieminių rugių žaliosios biomasės naudoja ne mažiau 25 kg ne didesniai kaip 1000 kg valomo naftos produktais užteršto grunto kiekiui.

Toks kiekis užtikrina grunte esančių naftą oksiduojančių mikroorganizmų intensyvią dauginimąsi ir efektyvią jų veiklą.

Vidutinio klimato juostoje į naftos produktais užterštą gruntą valomą *ex situ* sąlygomis žieminių rugių biomasę tolygiai paskleidžia užterštame valomajame grunte ir ją į valomą gruntą įterpia apariant pavasarį, gegužės pabaigoje – birželio pradžioje, kai valomo grunto temperatūra ne žemesnė kaip 12-14 °C.

Pasirinkti žieminiai rugiai tinkamiausi tuo, kad jie išaugina stiprias, galias šaknis. Jie sudygsta esant 1-2 °C grunto temperatūrai. Pavasarį, kai tik dingsta pašalas, intensyviai ima augti rugių augalo antžeminė dalis, gegužės pabaigoje, birželio pradžioje jų žalioji biomasė yra pakankama naftos produktais užteršto grunto biovalymo darbams *ex situ* sąlygomis atlikti.

Būdas realizuotas atrenkant žemės ūkio kultūras, tinkančias biovalymui. Atranka buvo atlikta remiantis laukinių augalų, atsparių naftos produktams, morfologinėmis ir fiziologinėmis savybėmis. Panaudotas biologinis indikacinis grunto užterštumo naftos produktais metodas kaip parodyta toliau pateiktame 1 pavyzdyje. Nustatyta, kad naftos taršai atspariausi yra tie augalai, kurie turi gerai išvystytą šaknų bei šakniastiebių sistemą. Tai *Calamagrostis epigejos*, *Carex arenaria*, *Carex hirta*, *Elytrigia repens*, *Leymus arenarius*, *Poa compressa*, *Artemisia campestris*, *Cirsium arvense*, *Convolvulus arvensis*, *Tanacetum vulgare*, *Tussilago farfara*. Atrankai buvo naudoti laukiniai (savaiminiai) augalai. Laukiniais augalais naudotasi kaip modeliniais augalais parenkant naftos produktams tolerantiškas žemės ūkio kultūras. Nustatyta, kad savaiminių augalų panaudojimas biovalymui gamybinėmis sąlygomis yra komplikuoatas. Sudėtinga surinkti jų sėklas. Juos galima auginti tik tam tikromis dirvožemio sąlygomis. Kur kas universalesnės ekologinių sąlygų požiūriu yra žemės ūkio kultūros.

Bandymais iš keliolikos žemės ūkio kultūrų buvo parinktos kelios kultūros, o iš jų kaip tinkamiausia biovalymui atrinkta žieminių rugių (*Secale cereale*) kultūra. Žieminiai rugiai išaugina stiprias, galias šaknis. Jie sudygsta esant 1-2 °C grunto temperatūrai. Jiems sudygti nereikia daug drėgmės. Pavasarį, kai tik dingsta pašalas, intensyviai ima augti antžeminė augalo dalis. Jo žalioji biomasė gegužės pabaigoje, birželio pradžioje yra pakankama naftos produktais užteršto grunto biovalymo darbams *ex situ* sąlygomis atlikti.

Uždavinio sprendimo esmė yra ta, kad natūralūs rugių želmenys, įterpti į naftos produktais (dyzelinas, mazutas) užterštą substratą, šių produktų skaidymą per 21 paros laikotarpį padidina (2 pavyzdys) palyginti su kontrole, 29-36 % (dyzelino – 36 %, mazuto – 29 %).

Bandymuose naudojant natūralią ir iškaitintą (prie 105 °C temperatūros per 1 parą) rugių želmenų biomasę nustatyta, kad masės kaitinimas jos poveikį naftos produktų skaidymui sumažina du kartus. Prieita išvados, kad kaitinant rugių biomasę (dėl ko susilpnėja jos destruktinis aktyvumas) sukeliamas biomasės baltymų koaguliacija ir tuo pačiu inaktyvuojamos fermentų sistemos, dalyvaujančios naftos skaidymo procese (šie fermentai yra dvikomponenčiai; sudaryti ir termolabiliaus baltymo, vadinamo apofermento, ir kofermento, į kurio sudėtį įeina B grupės vitaminai). Išsamesniam rugių biomasės katalizės savybių įvertinimui atliktas šios biomasės, termiškai neapdorotos ir termiškai apdorotos, poveikio tyrimas angliavandenilių dekan, heksadekano ir naftaleno skaidymui.

Buvo nustatyta (3 pavyzdys), kad termiškai neapdorota rugių biomasė (per palyginti trumpą laikotarpį – 7 paras) gerokai padidina angliavandenilių skaidymą (dekan sumažėjimas siekė 63 %, heksadekano – 24 %, sunkiai skaidomo naftaleno – iki 17 %). Termiškai apdorotos rugių biomasės poveikis naftos angliavandenilių skaidymui buvo 2-3 kartus mažesnis. Tas reiškinys susijęs su rugių biomasės fiziologiškai aktyvių medžiagų, ir pirmiausia fermentų, inaktyvacija. Įvertintas rugių biomasės fermentų – oksidazių, katalazių, peroksidazių – aktyvumas. Jis per visą tyrimo laikotarpį (7-21 paras) teigiamas ir gerai išreikštas (4 pavyzdys). Dar kartą buvo parodyta, kad naftos angliavandenilių skaidymo procesuose reikšmingą vaidmenį atlieka rugių želmenų biomasės biologiškai aktyvios medžiagos – aminorūgštys, vitaminai, chlorofilai, fermentai. Žinoma, kad naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM) augimui ir dauginimuisi reikalingos fiziologiškai aktyvios medžiagos. Dalis NOM geba savarankiškai sintetinti visus būtinus jų augimui organinius junginius. Jie vadinami prototrofais. Dalis NOM šio sintezės darbo nesugeba atlikti. Šiuos fiziologiškai aktyvius junginius jie turi gauti iš šalies. Šie NOM vadinami auksotrofais.

Rugių želmenų biomasė yra ne tik biogeninių (mineralinių) medžiagų, bet ir didelio aktyvumo junginių – aminorūgščių, vitaminų, chlorofilų, fermentų – šaltinis. Naftą oksiduojantys mikroorganizmai, tiek prototrofai, tiek auksotrofai, savo ląstelės statybai ir naftos angliavandenilių skaidančių fermentų sintezei gauna didelės vertės junginius,

LT 5579 B

palengvinančius tolesnės jų sintezės procesus. Rugių biomasės fermentai tiesiogiai panaudojami naftos angliavandenilių skaidymui. Rugių želmenų biomasės oksidacinis, katalazinis ir peroksidazinis aktyvumas rodo, kad ši biomasė savo fermentais geba dalyvauti, panašiai kaip ir NOM, naftos angliavandenilių skaidymo procesuose.

Didelis siūlomo grunto, užteršto nafta arba jos produktais, biologinio valymo būdo pranašumas, o kartu ir išradimo esmė yra ta, kad rugių žalioji biomasė į naftos produktais užterštą gruntą, valant jį *ex situ* sąlygomis, įterpiama (5 pavyzdys) esant didelei naftos taršai (iki 30 000 mg/kg grunto). Ši biomasė vidutinio klimato zonoje į valomą gruntą įterpiama ir tolygiai paskleidžiama visoje grunto storumėje pavasarį, gegužės pabaigoje-birželio pradžioje. Prieš įterpiant į gruntą rugių biomasė smulkinama, gaminami 2-3 cm ilgio kapojai, idant biomasės skystasis turinys būtų lengviau prieinamas grunto mikroorganizmams, dalyvaujantiems biovalymo procesuose, o skystojo turinio fermentai tiesiogiai oksiduotų naftos angliavandenilius.

Naudojamosios rugių žaliosios biomasės kiekis neturi būti mažesnis kaip 25 kg/1000 kg grunto, užteršto naftos produktais.

1 pavyzdys

Dirvožemio bei grunto taršą nafta ir jos produktais labai gerai parodo augalai. Augalų bendrijų degradavimo laipsnis – augalų rūšių sudėties, gausumo, derlingumo, dydžio, projekcijos sumažėjimo –priklauso nuo naftos koncentracijos grunte. Pagal išradimą parengtas biologinis indikacinis grunto užterštumo naftos produktais metodas (grunto užterštumo kriterijai) leidžia ne tik nustatyti taršos apimtį, bet ir išaiškinti labiausiai taršai atsparias augalų rūšis.

Grunto užterštumo mazutu įvertinimo kriterijai

Laipsnis	Grunto užterštumo įvertinimas	Rodiklis, rodantis augalijos būklės suprastėjimą, lyginant su kontrole (%)	Biologinės degradacijos laipsnis
0	Neužteršta	Mažiau kaip 5	0
1	Silpnai užteršta	6 – 10	I
2	Vidutiniškai užteršta (1)	11 – 25	II

3	Vidutiniškai užteršta (2)	26 – 50	III
4	Labai užteršta	51 – 75	IV
5	Ypač užteršta	Daugiau kaip 75	V

Vidutiniškai užteršta (2) rodo ribinę užterštumo mazutu koncentraciją – 5000 mg/kg sauso grunto.

Grunto užterštumą atitinkantys biodegradavimo laipsniai:

- 0 bendrijos sudarytos iš normaliai išsivysčiusių, jai būdingų rūšių augalų; rūšių skaičius, įvairovė ir projekcija atitinka bendrijos standartą.
- I bendrijų rūšių sudėtis ir struktūra panaši į natūralių, bet antropogeninį poveikį patiriančių bendrijų; augalai esti kiek žemesni, o rūšių įvairovė netgi didesnė dėl įsikuriančių ruderalinių rūšių (šiukšlynų ir užneštinių augalų rūšys).
- II rūšių skaičius ir projekcija maždaug 30 % mažesnė, augalai žemesni.
- III rūšių skaičius, projekcija, būdingų augalų aukštis ir gyvybingumas 50 % mažesnis negu natūralių augimviečių bendrijose.
- IV mažarūšės augalų grupuotės, sudarytos daugiausia iš vegetuojančių individų.
- V augalų danga sunaikinta, gali būti pavienių, atsitiktinių augalų.

2 pavyzdys

Siekiant nustatyti induočių augalų biomasės gebą skaidyti naftos angliavandenilius maksimaliai atsiribota nuo naftą oksiduojančių mikroorganizmų, tačiau jų neišvengta. Jie su naftos produktais pateko į bandinius.

Tyrimams substratu naudotas sterilus, iškaitintas (kad jame sudegtų jame esančios organinės medžiagos) smėlis. Panaudota rugių želmenų biomasė. Rugių želmenys auginami iki 25-30 cm aukščio. Tyrimams naudota gerai sutrinta, tyrelės pavidalo masė. Ji panaudota natūralioje (natyvinėje) būklėje ir iškaitinta 105 °C temperatūroje 24 val. (idant būtų inaktyvuotos fiziologiškai aktyvios medžiagos, potencialiai gebančios suardyti naftos angliavandenilius).

Tyrimai atlikti su dyzelinu ir mazutu.

Registruojami rodikliai:

- naftos produktų (dyzelino, mazuto) kiekio kaita po 7, 17 ir 27 parų;

- vandenilio jonų koncentracijos (pH) dinamika tais pačiais intervalais.

Tyrimai atlikti 25 °C temperatūroje.

Tyrimo (dešimtanario) schema buvo tokia:

- 1 Kontrolė – 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml dyzelino.
- 2 Kontrolė – 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml mazuto.
- 3 1 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml dyzelino + 200 g sutrintų rugių želmenų.
- 4 2 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml dyzelino + 50 g sutrintų rugių želmenų.
- 5 3 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml dyzelino + 200 g iškaitintų rugių želmenų.
- 6 4 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml dyzelino + 50 g iškaitintų rugių želmenų.
- 7 5 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml mazuto + 200 g sutrintų rugių želmenų.
- 8 6 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml mazuto + 50 g sutrintų rugių želmenų.
- 9 7 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml mazuto + 200 g iškaitintų rugių želmenų.
- 10 8 variantas - 2 kg sterilaus smėlio + 20 ml mazuto + 50 g iškaitintų rugių želmenų.

Vandenilio jonų koncentracija (pH) tyrimo variantuose kito mažai. Ji svyravo 6,5-7,5 ribose.

Tyrimai parodė teigiamą rugių želmenų biomasės poveikį naftos produktų (dyzelino, mazuto) biodestrukcijai. Natūralūs rugių želmenys (200 g/2 kg substrato) dyzelino skaidymą per 21 parą, palyginti su kontrole, padidino 36 %, mazuto – 29 %. Iškaitintų rugių želmenų poveikis dyzelino ir mazuto skaidymui buvo du kartus mažesnis. Rugių želmenys vertinami kaip naftą oksiduojančių mikroorganizmų mitybos šaltinis. Juose be pagrindinių biogeninių elementų – mineralinių medžiagų, angliavandenių ir baltymų yra fiziologiškai aktyvių medžiagų – laisvųjų aminorūgščių, vitaminų, chlorofilo, fermentų. Iškaitintų rugių želmenų biomasės poveikis naftos produktų destrukcijai susilpnėja dėl biomasės baltymų koaguliacijos ir fermentų inaktyvacijos. Fermentai, skaidantys naftos produktus, yra sudaryti iš dviejų komponentų: termolabilaus baltymo, vadinamo apofermentu ir kofermento, į kurio sudėtį įeina B grupės vitaminai niacinas, B₂ (riboflavinas), B₁ (tiaminas), pantoteno rūgštis ir B₁₂ (kobalaminas), taip pat geležis (Fe), varis (Cu), cinkas (Zn), kobaltas (Co), molibdenas (Mo).

Iškaitindami rugių želmenis sumažiname kai kurių termolabilių B grupės vitaminų koncentraciją, koaguluojame fermentų baltymus ir tuo pačiu inaktyvuojame pačius fermentus. Be to, tirpius kalcio hidrofosfatus paverčiame netirpiaisiais. Terminis rugių želmenų apdorojimas

padėjo atskleisti pagrindines priežastis, dėl kurių žymiai sumažėjo naftos produktų biodestrukcijos katalitinės galios.

3 pavyzdys

Išsamesniam rugių biomasės katalitinių savybių įvertinimui atliktas šios biomasės (natūralios ir iškaitintos) poveikis naftos angliavandenilių skaidymui tyrimas.

Tyrimui buvo naudojami sterilūs angliavandeniliai: dekanas, heksadekanas, naftalenas. Dekanas (n-dekanas), $C_{10}H_{22}$, molekulinė masė 142, 29 g/mol, alkanų grupės angliavandenilis, lydimosi temperatūra – 30 °C, virimo – 174 °C, tyrimui naudota 0,5 % ir 0,1 % koncentracijos dekanas.

Heksadekanas (n-heksadekanas), $CH_3(CH_2)_{14}CH_3$, molekulinė masė 226,45 g/mol, alkanų grupės angliavandenilis, lydimosi temperatūra – 18 °C, virimo – 287 °C, tyrimui naudota 0,5 % koncentracijos heksadekanas.

Naftalenas, $C_{10}H_8$, molekulinė masė 128,6 g/mol, daugiažiedis aromatinis angliavandenilis, virimo temperatūra – 218 °C, lydimosi – 80,5 °C, tyrimui naudota 0,5 % koncentracijos naftalenas.

Substratu naudota Čapeko mitybinė terpė be sacharozės.

Sterilios rugių sėklos išsėtos ant sterilaus filtravimo popieriaus ir 20 parų augintos bokse iki želmenys pasiekė 30 cm aukštį. Želmenys sutrinti iki tyrelės. Tyrelės dalis panaudota natūralios būklės, kita dalis panaudota termiškai (iškaitinta per 24 val. 105 °C temperatūroje) ją apdorojus.

Sudaryta tokia bandymų schema:

Kontrolė – Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % dekanu.

Kontrolė – Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % heksadekanu.

Kontrolė – Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % naftalenu.

1 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % dekanu + rugių biomasės 10 %, termiškai neapdorota.

- 2 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % dekanu + rugių biomasės 2,5 %, termiškai neapdorota.
- 3 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,1 % dekanu + rugių biomasės 10 %, termiškai neapdorota.
- 4 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % dekanu + rugių biomasės 10 %, termiškai apdorota.
- 5 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % dekanu + rugių biomasės 2,5 %, termiškai apdorota.
- 6 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,1 % dekanu + rugių biomasės 10 %, termiškai apdorota.
- 7 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % heksadekanu + rugių biomasės 10 %, termiškai neapdorota.
- 8 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % heksadekanu + rugių biomasės 10 %, termiškai apdorota.
- 9 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % naftalenu + rugių biomasės 10 %, termiškai neapdorota.
- 10 variantas - Čapeko terpė be sacharozės su 0,5 % naftalenu + rugių biomasės 10 %, termiškai apdorota.
- Bandymo trukmė – 7 paros.

Patikrintas tyrime naudotų angliavandenilių garavimo intensyvumas. Po 7 parų kontrolinėse kolbose nustatyta, kad dekanų kiekis sumažėjo 70,5 %; naftaleno – 26,4 %; heksadekano – 5,0 %. Angliavandenilių skaidymo intensyvumo apskaita atlikta remiantis likusiu po nugaravimo angliavandenilio kiekiu.

Tyrimų rezultatai parodė ryškų angliavandenilio dekanų sumažėjimą variantuose su Čapeko terpe ir žaliaja rugių želmenų biomasė. Tas sumažėjimas siekė beveik 63 % (0,1 % dekanų + 10 % želmenų biomasės) ir daugiau (0,5 % dekanų + 10 % želmenų biomasės). Mažiau suskaidyta dekanų (55 %) tame variante, kuriame biomasės 2,5 % (2 variantas). Dekanų sumažėjimas variantuose (4, 5, 6), kai panaudota termiškai apdorota rugių želmenų biomasė, siekia apie 18 % ir yra tris kartus mažesnė palyginti su tais atvejais, kai naudota žalioji rugių želmenų biomasė. Tas rodo, kad terminis želmenų biomasės apdorojimas inaktyvuoja jos fiziologiškai aktyvias medžiagas.

Heksadekanas skaidomas silpniau nei dekanas. Variante su termiškai neapdorota rugių biomasė nustatyta 24 % angliavandenilio, o su termiškai apdorota du kartus mažiau – 12 %.

Dar silpniau skaidomas naftalenas, nuo 5 % (10 variantas) iki 17% (9 variantas). Dėsnigumas išlieka tas pats: kai naudojama termiškai neapdorota rugių biomasė, skaidymo efektas yra 2-3 kartus didesnis palyginti su termiškai apdorotu rugių biomasės variantu, ir tas yra susijęs su fiziologiškai aktyviomis medžiagomis, jų inaktyvacija.

4 pavyzdys

Įvertinta rugių biomasės fermentų įtaka naftos angliavandenilių degradacijai.

Tyrimui panaudota heksadekanas 0,5 % ir dyzelinas 1,0 %.

Angliavandeniliai naudoti sterilioje M9 mineralinių druskų terpėje be anglies šaltinio (Sambrook ir kt., 1989).

Naudota žalioji rugių biomasė, 2,5 % jos kiekio terpėje.

Nustatyta angliavandenilių kiekio kaita į 7, 14 ir 21 parą. Dyzelino angliavandenilių frakcijų kiekis nustatytas chromatografiniu būdu.

Įvertintas oksidacinis, katalazinis ir peroksidazinis aktyvumas. Oksidaciniam aktyvumui nustatyti naudotas 1 % NNN'N'-tetra-metil-p-fenilendiamino dichlorido ir 1 % askorbo rūgšties tirpalų mišinys santykiu 1:1.

Katalazinis-peroksidazinis aktyvumas įvertintas 0,2 % katecholio ir 1 % vandenilio peroksido H_2O_2 tirpalu 1:1.

Darbo schema sudaryta tokia:

Kontrolė - mineralinė terpė be anglies šaltinio + 2,5 % rugių želmenų biomasės.

1 variantas - mineralinė terpė be anglies šaltinio + 2,5 % rugių želmenų biomasės + 0,5 % heksadekano.

2 variantas - į nesterilią dirvą įnešta 1,0 % dyzelino, kuri sumaišoma su 2,5 % rugių želmenų biomasės.

Tyrimas parodė, kad heksadekano kiekis skystoje mineralinėje terpėje su žaliaja rugių biomase sumažėja 64 %. Analogiški rezultatai gauti su dyzelino kiekio ir jo frakcijų kitimu dirvožemyje, sumaišytame su rugių želmenų biomase. Dyzelino buvo suskaidyta beveik 70 %, iš kurių alkanų frakcijai tenka 65 %, o aromatinei – 5 %.

Rugių želmenų biomasės fermentinio aktyvumo duomenys pateikiami lentelėje

Fermentai	Paros		
	7	14	21
Oksidazės	+	+	+
Katalazė	+	+	+
Peroksidazė	+	+	+

Tyrimo duomenys rodo, kad naftos angliavandenilio heksadekano bei dyzelino (alkanų ir aromatinės frakcijos) skaidymo procesuose reikšmingą vaidmenį atlieka rugių želmenų biomasės fiziologiškai aktyvios medžiagos (aminorūgštys, vitaminai, chlorofilai, fermentai).

Rugių biomasėje gerai išreikštas oksidacinis, katalazinis ir peroksidazinis aktyvumas.

Rugių želmenų potenciniam oksidacinių redukcinių fermentų aktyvumui įvertinti buvo atliktas papildomas bandymas jodometriniu būdu. Buvo panaudota 25 g rugių želmenų. Jie buvo sutrinti su 10 ml metafosforo rūgšties (šią rūgštį naudojame 5 proc.). Turinį perkeliame į 100 ml matavimo indą (grustuvėlį nuplauname ta pačia metafosforo rūgštimi, o tirpalą supilame į tą patį matavimo indą). Indą metafosforo rūgštimi papildome iki 100 ml. Mišinį paliekame stovėti 3 val. (karts nuo karto jį maišome, suplakame). Po to filtruojame pro popierinį filtrą. Imame 25 ml filtrato. Į filtratą pridedame keletą lašų krakmolo kleisterio (naudojame 1 % krakmolo kleisterį). Titruojame jį Liugolio tirpalu (0,005 nJ tirpalo ištirpinto KJ tirpale) iki pamėlynavimo.

Oksidacinis redukcinis 100 g rugių želmenų aktyvumas nustatytas pagal formulę

$$X = \frac{a \times b \times 100}{c} \text{ ml } 0,005 \text{ nJ tirpalo,}$$

kur a – titravimui sunaudoto jodo tirpalo kiekis ml, b – praskiedimas, c – analizuojamos medžiagos masė.

Tyrimai parodė, kad rugių želmenų (100 g) potencinis redukcinis aktyvumas išreiškiamas 227,2 ml 0,005 nJ tirpalo.

5 pavyzdys

Atliktas rugių žaliosios biomasės panaudojimo naftos produktų – mazuto skaidymui tyrimas gamybinėmis sąlygomis. Valomo, užteršto mazutu (10 000 mg/kg) grunto sklype parinkti keturi 50 m² dydžio bareliai – 2 kontroliniai ir 2 bandomieji. Mazutą sudaro tokie angliavandenilių kompleksai (%): parafinų-naftenų angliavandeniliai – 15; olefinai ir ciklodiolefinai – 5; alkilaromatiniai angliavandeniliai – 1; alkildiaromatiniai angliavandeniliai – 4; poliaromatiniai angliavandeniliai – 20; benzeno dervos – 30; alkoholio benzeno dervos – 25.

Tiek kontroliniuose, tiek bandomuosiuose bareliuose vandenilio jonų koncentracija (pH) buvo 6,5-7,5 ribose. Valomas gruntas vienodai buvo tręšiamas mineralinėmis NPK trąšomis. Jis inokuliuotas naftą oksiduojančių mikroorganizmų kompleksu. Palaikoma grunto normali drėgmė (60 % jo vandentalpos). Gruntas aeruojamas, reguliariai jį purenant ir homogenizuojant.

Į valomą gruntą (2 barelius), kurio sluoksnio storis 40 cm ir svoris 64 000 kg įterpta rugių žaliosios masės 1600 kg.

Tyrimas parodė, kad rugių žalioji biomasė mazuto skaidymą, palyginti su kontrole, padidina tokiu mastu, kuris prilygsta laboratorinėmis sąlygomis gautiems rodikliams.

Patentuojamas grunto, užteršto nafta arba jos produktais, biovalymo būdas panaudojant indučių augalų žaliosios biomasės fermentus leidžia efektyviai valyti užterštą gruntą *ex situ* arba *in situ* esant grunto užterštumo naftos produktais didelei koncentracijai, siekiančiai 29 000-30 000 mg/kg sauso grunto, kartu leidžia atpiginti šį procesą naudojant nebrangias vietines žemės ūkio kultūras, padedančias intensyvuoti svarbių naftą skaidančių mikroorganizmų veiklą ir aktyviai veikiančią naftos angliavandenilių biodegradaciją. Patentuojamas būdas gali būti efektingai panaudotas avarijų metu į gruntą patekusiems angliavandeniliams teršalams likviduoti vidutinio klimato juostoje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Grunto, užteršto nafta arba jos produktais, biologinio valymo būdas, kai į užterštą gruntą įterpia mineralinių trąšų, užterštą gruntą įdirba, homogenizuoja ir aeruoja jį periodiškai kultivuojant, užterštą gruntą drėkina, besiskiriantis tuo, kad esant grunto užterštumo naftos produktais didelei koncentracijai, siekiančiai 29 000-30 000 mg/kg sauso grunto, į gruntą pradinėje jo valymo stadijoje įdeda fermentų (oksidazių, katalazių, peroksidazių), svarbių naftą skaidančių mikroorganizmų veiklai intensyvinti bei gebančių savarankiškai skaidyti naftos angliavandenilius.
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad kaip fermentų (oksidazių, katalazių, peroksidazių), gebančių savarankiškai skaidyti naftos angliavandenilius, šaltinį naudoja induočių augalų - žemės ūkio kultūrų susmulkintą žaliąją biomasę.
3. Būdas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad kaip induočių augalų - žemės ūkio kultūrų susmulkintą žaliąją biomasę naudoja žieminių rugių (*Secale cereale*) susmulkintą biomasę.
4. Būdas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtą žieminių rugių susmulkintą biomasę gamina žieminių rugių augalus smulkinant, kol minėtų augalų kapojai siekia nuo maždaug 1,5 iki maždaug 3,5 cm ilgio bei išsiskiria augalinės masės skystasis turinys.
5. Būdas pagal 2-4 punktus, besiskiriantis tuo, kad žieminių rugių žaliosios biomasės naudoja ne mažiau 25 kg ne didesniai kaip 1000 kg valomo naftos produktais užteršto grunto kiekiui.
6. Būdas pagal 2-5 punktą, besiskiriantis tuo, kad žieminių rugių žaliąją biomasę tolygiai paskleidžia užterštame valomajame grunte ir ją į valomą gruntą įterpia apariant.
7. Būdas pagal 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad vidutinio klimato juostoje į naftos produktais užterštą gruntą valomą *ex situ* sąlygomis žieminių rugių biomasę tolygiai paskleidžia užterštame valomajame grunte ir ją į valomą gruntą įterpia apariant pavasarį, gegužės pabaigoje – birželio pradžioje, kai valomo grunto temperatūra ne žemesnė kaip 12-14 °C.