

(19)



(10) **LT 2013 115 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2013 115** (51) Int. Cl. (2015.01): **C12N 1/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2013 10 14** **C02F 3/00**
B09C 1/00

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 04 27**

(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: —

(71) Pareiškėjas:

UAB „BIOCENTRAS”, V.A. Graičiūno g. 10, LT-02241 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Saulius GRIGIŠKIS, LT

Vilma ČIPINYTĖ, LT

Julius VAITOŠKA, LT

Jolanta AIKAITĖ-STANAITIENĖ, LT

Indrė GAILŪTĖ, LT

Gražina RAČKAUSKIENĖ, LT

Fortūnatas GRYGAS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Reda ŽABOLIENĖ, Advokatės Redos Žabolienės kontora METIDA, Verslo centras VERTAS, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas

(57) Referatas:

Šis išradimas priskiriamas aplinkosauginių biotechnologijų sričiai. Jame aprašytas aplinkos objektų valymas nuo naftos teršalų (NT), kuomet jie apdorojami naftos angliavandenilius emulguojančiais ir oksiduojančiais bakteriniais preparatais bei fitoatstatymą užtikrinančiais augalais. Šis būdas yra naudojamas gruntui ir sūriam bei gėlam vandenims valyti. Šiame išradime yra siūlomas naujas kompleksinis NT valymo būdas, kuris pilnai ar bent didžiąja dalimi išsprendžia esamus aplinkos valymo nuo NT trūkumus. Nuo žinomų naftos teršalų valymo būdų išradimas skiriasi tuo, kad NT valymas yra valdomas panaudojant ekspertinę sistemą, kurios veikimas apima pradinės NT sudėties bei aplinkos parametrų įvertinimą, NT valymo būdo, NT biodegraduojančių mikroorganizmų derinių parinkimą, šiuos derinius sudarančių mikroorganizmų optimalių koncentracijų parinkimą, optimalių NT atskyrimo ir biodegradavimo parametrų parinkimą ir tinkamiausių augalų rūšių parinkimą fitoatstatymui.

Kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas

TECHNIKOS SRITIS

Šis išradimas priskiriamas aplinkosauginių biotechnologijų sričiai. Jame aprašytas aplinkos objektų valymas nuo naftos teršalų (NT), kuomet jie apdorojami naftos angliavandenilius emulguojančiais ir oksiduojančiais bakteriniais preparatais bei fitoatstatymą užtikrinančiais augalais. Šis būdas yra naudojamas gruntui ir sūriam bei gėlam vandenims valyti.

TECHNIKOS LYGIS

Viena iš taršos rūšių, su kuria dažniausiai susiduriama, yra tarša nafta ir jos produktais. Išgavus naftą, ji transportuojama vis didesniais atstumais, dėl to padidėja avarijų tikimybė, o jos naudojimas sukelia šiltnamio efektą didinančių dujų išsiskyrimą, kas veikia įvairių regionų ekologinę būklę. Nustatyta, kad per metus vien tanklaivių avarijose prarandama apie 1 mln. t naftos produktų, iš kurių 1/3 yra lengvosios frakcijos, kurios išgaruoja į aplinką, o kita dalis patenka į krantą ar nusėsta jūrose. Naftos perdirbimo metu, valant ją nuo pašalinių medžiagų, susidaro naftos šlamai. Tai – daugiausia sunkiosios naftos angliavandenilių frakcijos, absorbuotos durpėse ar grunte. Taip pat susidaro dideli nafta užteršto vandens kiekiai, kuriuos sunku išvalyti. Vos patekę į aplinką, naftos teršalai (NT) yra toksiški biologinei aplinkai, taip pat ir žmogui. Yra daugybė naftos produktų rūšių, pasižyminčių skirtingomis savybėmis. Nevienodas ir jų kenksmingumas aplinkai. Pavojingiausi yra lakieji, aplinkoje greitai išsisklaidyti gebantys naftos produktai. Tai – benzinas, žibalas, dyzelinas ir kiti skystos konsistencijos produktai. Kietojo fizinio būvio naftos produktai, tokie kaip bitumas, aplinkai mažai arba visiškai nepavojingi, todėl toliau bus aptartos tik skystojo būvio NT atmainos. Naftos angliavandeniliais užterštas dirvožemis ir vanduo yra valomi fizikiniais, cheminiais ar biologiniais metodais. Tačiau, dirvožemį valant biologiniu būdu, ne visada pasiekiamas norimas rezultatas, nes naftos teršalus oksiduojančių mikroorganizmų efektyvumui įtakos turi sezoniniai temperatūros pokyčiai ir per didelės NT koncentracijos jame. Vis plačiau taikomas fitoatkūrimo metodas, naudojant augalus naftos teršalams šalinti iš dirvožemio, kadangi šis valymo būdas reikalauja mažiau sąnaudų nei kiti biologinio valymo metodai. Taikant fitoatkūrimą, užterštas dirvožemis prieš tai turi būti papildomai valomas, kad NT koncentracijos sumažėtų iki optimalių augalams

vegetuoti. Didėjant aplinkos valymo darbų apimtims, iškyla poreikis juos optimizuoti. Tik naujų kompleksinių technologijų kūrimas ir jų optimalus valdymas bei naujų biopreparatų kūrimas ir taikymas leidžia išspręsti iškilusias problemas.

Patentinėje literatūroje yra aprašomi įvairūs naftą oksiduojantys ir paviršiaus aktyvias medžiagas sintetinantys mikroorganizmai. Pavieniai naftą oksiduojantys mikroorganizmai (NOM) ir jų asociacijos yra naudojamos dirvožemio, vandens valymui. Bakterinės kilmės paviršiaus aktyvios medžiagos (BKPAM) ir sintetinės paviršiaus aktyvios medžiagos (SPAM) naudojamos organinių teršalų išplovimui iš aplinkos (vandens, dirvožemio) ar biodegradavimo gerinimui. Taip pat yra patentų, kuriuose aprašomas NT šalinimas augalais.

Yra žinomi NOM, kurie naudojami aplinkai nuo naftos teršalų valyti: *Azotobacter vinelandii* 21 štamai, aprašyti LT patente nr. 3111 B, *Pseudomonas fluorescens* IGN 57, aprašyti LT patente nr. 4792 B, *Candida lipolytica* C. 6.1-5 aprašyti LT patente nr. 4793 B. Didžiausias šių mikroorganizmų naudojimo trūkumas yra tas, kad pavienių štamų sintetinių fermentų nepakanka NT esantiems junginiams pilnai suskaidyti.

Patente US 6,652,752 B2 aprašomas valymo būdas, kai NOM iš pradžių yra išskiriami iš aplinkos ir pagausinami, o po to jų mišri kultūra naudojama NP užteršto vandens ir naftuoto šlamo valymui reaktoriuje. Būdas tinkamas naudoti naftuoto šlamo valymui, kai šis užterštas sočiais ir aromatiniais angliavandeniliais, asfaltenais, dervomis. Biodegradacijai padidinti yra naudojami mitybiniai priedai, paviršiaus aktyvios medžiagos, aeruojama ir palaikoma optimali pH reikšmė.

Šio valymo būdo trūkumai yra: naudojant neidentifikuotų NOM kultūrą sudėtinga valdyti NT biodegradacijos procesą; NT biodegradaciją galima atlikti tik ex situ.

Žinomi aplinkos valymo nuo NT būdai, kai biodegradacijai naudojami gryni mikroorganizmų kultūrų deriniai. Pavyzdžiui, patente LT 5057 B aprašomas nafta ir jos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti skirtas biopreparatas, kuriame yra hidrofilinių ir lipofilinių NOM mišinys. Šio biopreparato trūkumas tas, kad jis efektyviai veikia siaurame temperatūros diapazone, be to, tik esant nedidelėms naftos angliavandenilių koncentracijoms.

Patente RU 2266958 aprašyti NOM štamai *Zoogloea* sp. 14H, *Arthrobacter* sp. 13H, *Arthrobacter* sp. 15H, *Bacillus* sp. 3H, *Bacillus* sp. 12 ir jų pagrindu sukurta asociacija, kurie yra naudojami naftos angliavandeniliais užterštiems vandens

telkiniams ir dirvožemiui valyti. Patente nurodyta, kad šių štamų augimas yra neslopinamas, kai naftos ir mazuto koncentracija yra atitinkamai 15 ir 10 %. Tačiau šie NOM naftos angliavandenilius pilnai suskaido tik esant mažai jų koncentracijai: naftos - 0,5-0,7 %, o mazuto - 0,4-0,5%.

Patente US 6,649,400 aprašomi NOM, priklausantys *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* ir *Moraxella* gentims. Šie NOM štamai atskirai ar deriniuose yra skirti aplinkai valyti nuo sunkiųjų naftos angliavandenilių.

Patente US 5,494,580 aprašytas angliavandeniliais užterštos aplinkos valymo būdas naudojant mikroorganizmus ar jų mišinius, kurie parenkami pagal NT sudėtį ir kiekį bei užterštos aplinkos charakteristikas. Angliavandenilių skaidymui naudojami mikroorganizmai *Azotobacter vinelandii* 21, *Pseudomonas sp.9*, *Pseudomonas sp.19*, *Pseudomonas sp.31* ir *Acinetobacter calcoaceticus* 23.

Šio patento trūkumas yra tas, kad sunkieji naftos angliavandeniliai skaidomi gana ilgai.

Patente US 2009/0325271 aprašytas nafta ir jos produktais užteršto dirvožemio valymo būdas, kai pirmajame etape naudojami naftą emuliuojančių mikroorganizmų (NEM) štamai *Pseudomonas aeruginosa* IOCX ir *Pseudomonas aeruginosa* IOCX DHT, atskiriantys NT nuo dirvožemio dalelių. NOM štamai *Pseudomonas putida* IOC5a1, *Pseudomonas putida* IOCR1 ir *Bacillus subtilis* pradedami taikyti bent dviem savaitėm vėliau nei NEM.

Šio patento trūkumas – nenurodoma, kokiems NT šalinti ir kokiose NT koncentracijos ribose dirvožemyje šie NEM ir NOM yra taikomi.

Taip pat yra aprašytas naftos angliavandenilių šalinimo iš dirvožemio būdas, kai naudojami aukštesnieji augalai ir NOM. Pavyzdžiui, patente US 2004/0101945 yra aprašytas poliaromatinių junginių šalinimo iš aplinkos būdas naudojant sistemą sudarytą iš: bent vieno tinkamo augalo-šeimininko, kuris išskiria į aplinką fermentus, skaidančius organinius teršalus ir vieno mikroorganizmo, sugebančio skaidyti organinius junginius, gerinančio augalo-šeimininko daigumą, augimą ir išgyvenimą. Rekomenduojami mikroorganizmai yra *Burkholderia* ATCC Nr. PTA-4755, *Burkholderia* ATCC Nr. PTA-4756, *Sphingomonas* ATCC No. PTA-4757. Šio patento trūkumas – ribotas pritaikymas dirvožemio valymui nuo NT, kadangi naftoje ir jos produktuose poliaromatinių junginių nėra daug.

Patente LT 4593 aprašytas dirvožemio nuo NT valymo būdas, tinkamas naudoti biologinio valymo baigiamoje stadijoje, kai į valomą dirvožemį įterpiama

organinių ir mineralinių trąšų, apšėjama atspariomis NP ir mažiau reikliomis dirvai žemės ūkio kultūromis, kurių rizosfera imobilizuoja naftą oksiduojančius mikroorganizmus, kultūros auginamos, kol grunto užterštumas sumažėja iki leistino lygio, ir po to gruntas su augalų biomase apariamas.

Šio patento trūkumas - aprašytas NT valymo būdas yra naudojamas tik esant mažai, ne didesnei kaip 6000-7000 mg/kg sauso grunto, užterštumo naftos produktais koncentracijai.

Aukščiau aprašyti NT valymo būdai pilnai neišsprendžia visų su pramoniniais aplinkos valymo nuo NT procesais susijusių problemų:

- sudėtingi aplinkos valymo nuo NT procesai reikalauja aukštos kvalifikacijos žmogiškųjų išteklių;
- nėra universalios technologijos skirtingiems aplinkos objektams ir teritorijoms valyti nuo NT;
- nėra efektyvios technologijos aplinkai valyti nuo NT, esant skirtingoms klimatinėms sąlygoms;
- nėra siūloma sprendimų aplinką valyti nuo senų NT;
- nėra kompleksinio, biotechnologiniais procesais pagrįsto, būdo aukščiau išvardintoms problemoms spęsti;
- nėra specialaus valdymo proceso pagrindu sukurto sisteminio ir efektyvaus aplinkos valymo nuo NT valdymo.

IŠRADIMO ESMĖ

Išradimo tikslas – panaikinti įvairių aplinkos objektų taršą naftos angliavandeniliais ir atstatyti jų pirminę būseną, nesukeliant antrinės taršos, tam pasitelkiant natūralias biopriemones, t.y. NEM ir NOM pagrindu sukurtus bioproduktus bei augalus fitoatstatymui.

Išradimo esmė yra kompleksinis, biotechnologiniais procesais pagrįstas, aplinkos valymas nuo NT, valdomas specialios ekspertinės sistemos (ES), parenkančios optimaliausius valymo technologinius parametrus: NEM ir NOM derinius, valymo sąlygas bei fitoatstatymą užtikrinančius augalus.

Šiame išradime yra siūlomas naujas kompleksinis NT valymo būdas, kuris pilnai ar bent didžiąja dalimi išsprendžia esamus aplinkos valymo nuo NT trūkumus. Nuo žinomų naftos teršalų valymo būdų išradimas skiriasi tuo, kad NT valymas yra valdomas panaudojant ES, kurios veikimas apima pradinės NT sudėties bei aplinkos

parametrų įvertinimą, NT valymo būdo, NT biodegraduojančių mikroorganizmų derinių parinkimą, šiuos derinius sudarančių mikroorganizmų optimalių koncentracijų parinkimą, optimalių NT atskyrimo ir biodegradavimo parametrų parinkimą ir tinkamiausių augalų rūšių parinkimą fitoatstatymui.

Antras skirtumas pasireiškia tuo, kad naftos angliavandeniliais užteršti aplinkos objektai valomi mikroorganizmų deriniais atrinktais iš NEM grupės, susidedančios iš *Pseudomonassp. NJ13*, *Acinetobacter sp. PR82*, *Acinetobacter sp. N3* bei iš NOM grupės, susidedančios iš *Acinetobacter sp. N3*, *Acinetobacter sp. NJ9*, *Acinetobacter NJ5* ir apima šias pakopas:

- a) užterštos aplinkos įvertinimą ir NT sudėties bei kiekio nustatymą;
- b) NEM parinkimą, bioprieinamumui padidinti;
- c) NOM parinkimą tokiu būdu, kad gauti biopreparatai veiktų plačiose naftos angliavandenilių koncentracijų ribose, esant skirtingiems naftos angliavandeniliams bei aplinkos parametrams: reljefams, temperatūroms, drėgmei ir atmosferos slėgiams;
- d) naftos angliavandeniliais užterštos aplinkos kontaktavimą su NT biodegraduojančių mikroorganizmų deriniais;
- e) NT atskyrimą ir suskaidymą vienu metu, naudojant NEM ir NOM;
- f) fitoatstatymo panaudojimą likutinių NT išvalymui ir dirvožemio savybių atkūrimui.

Trečias skirtumas pasireiškia tuo, kad (b) pakopoje naudojamas biopreparatas gali pasižymėti ir NEM ir NOM savybėmis.

Ketvirtas skirtumas pasireiškia tuo, kad kompleksinis NT valymo būdas naudojamas skirtingų fizikinių ir cheminių savybių bei struktūros naftos angliavandenilių biodegradavimui.

Penktas skirtumas pasireiškia tuo, kad naudojant NEM ir NOM derinius skirtinguose aplinkos objektuose gali būti išvalomi NT koncentracijų ribose nuo maksimalios (~100 %) iki minimalios (~0 %) koncentracijų, geriausiai koncentracijų ribose nuo 35 iki 0 %.

Šeštas skirtumas pasireiškia tuo, kad NT oksiduojantys mikroorganizmai gali būti panaudoti derinyje su SPAM.

Septintas skirtumas pasireiškia tuo, kad NT oksiduojantys mikroorganizmai gali būti panaudoti derinyje su BKPAM.

Aštuntas skirtumas pasireiškia tuo, kad vanduo, panaudotas NT išplovimui iš grunto, gali būti panaudotas to paties grunto drėkinimui, kadangi likusieji NT iš jo pašalinami.

Devintas skirtumas pasireiškia tuo, kad BKPAM ar SPAM tirpalai yra naudojami daug kartų, prieš tai kaskart nuo jų atskiriant NT.

Dešimtas skirtumas pasireiškia tuo, kad bakterinės kilmės PAM tirpale yra gyvų NEM ląstelių.

Vienioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad NT emulgavimas atliekamas pH 6-11 intervale ir 20-90 °C temperatūrų intervale.

Dvyliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad NT skaidymas su NOM atliekamas esant pH 2-8,5 intervale ir 4-40°C temperatūrų intervale, geriausiai esant pH=7 ir 30°C temperatūrai.

Tryliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad kompleksinis NT valymas yra atliekamas *in situ* arba *ex situ*.

Keturioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad kompleksinis NT valymas gali būti pradedamas *ex situ* ir po migruojančios NT frakcijos pašalinimo gali tęsiamas *in situ*.

Penkioliktas skirtumas pasireiškia tuo, kad po aplinkos valymo nuo NT, panaudojant NEM ir NOM derinius, yra taikomas fitoatstatymas.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

1 pav. NT šalinimo procesų valdymo principinė schema

2 pav. NT emulguojančių biopreparatų paruošimo principinė schema

3 pav. NT oksiduojančių biopreparatų paruošimo principinė schema

4 pav. Kompleksinio NT šalinimo iš vandens (a) ir grunto (b) principinės schemas

5 pav. NT išplovimo iš užteršto grunto technologinė schema

6 pav. NT užteršto vandens valymo technologinė schema

7 pav. Atviro tipo NT šalinimo iš grunto technologinė schema

8 pav. Kompleksinio NT šalinimo iš grunto biodegradacijos būdu technologinė schema

TINKAMIAUSI ĮGYVENDINIMO VARIANTAI

NT valymo iš įvairių aplinkos objektų procesas yra koordinuojamas pasitelkiant ES (1 pav.). Tokios sistemos veikimas paremtas informacijos iš NT išsiliejimo vietos surinkimu ir panaudojimu NT valymo procesams valdyti. Šios sistemos pagalba yra parenkami optimaliausi teritorijų valymo nuo NT technologiniai parametrai ir jų pagrindu atrenkamas (parengiamas) aplinkosauginių biotechnologijų metodais pagrįstas NT pašalinimo scenarijus. Kompleksinis NT šalinimas atliekamas pasitelkiant bioproduktus, sukurtus NEM ir NOM pagrindu bei fitoatstatymą augalais.

Naftą degraduojančiomis savybėmis pasižymintiems bioproduktams sukurti buvo atrinkti geriausiai naftos angliavandenilius emulguojantys ir oksiduojantys mikroorganizmai.

Naftos teršalus geriausiai emulsuoja *Pseudomonas sp. NJ13*, *Acinetobacter sp. Pr82* ir *N3* mikroorganizmų štamai. Šių mikroorganizmų štamai deponuoti UAB „Biocentras“ mikroorganizmų kolekcijoje. Jų charakteristikos yra:

Pseudomonas sp. NJ13 štamai (UAB „Biocentras“ kolekcijos registracijos numeris B-96-8N) buvo išskirtas iš nafta užteršto vandens telkinio prie Neftejugansko miesto Tiumenės srityje (Rusija).

Ląstelės. Ląstelės lazdelių bukais galais formos, jų dydis 0,5-0,6 x 1,0-2,3 µm. Ląstelės judrios, matomos pavienės ar sukibusios poromis lazdelės, pagal Gramą dažosi neigiamai, endosporų nesudaro.

Kolonijos. Ant standžios mitybinės terpės po 24 val. išauga lygiu paviršiumi iškilios, blizgios, kreminės spalvos lygiais kraštais kolonijos, kurių konsistencija yra gleivėta.

Fiziologinės - biocheminės savybės. Tai aerobas. Katalazės ir oksidazės reakcijos teigiamos, hidrolizuoja želatiną. Kamienui augti optimali temperatūra 25-30 °C ir pH 7,0. Kaip anglies ir energijos šaltinį naudoja gliukozę oleino rūgštį, dyzeliną, naftą, oktadekaną, krakmolą, alyvuogių bei saulėgrąžų aliejų, natrio acetatą.

Remiantis 16S rDNR geno analize, šis mikroorganizmas artimiausias *Pseudomonas sp.* genčiai, pavaizduotai SEQ ID Nr. 1.

Acinetobacter sp. PR82 štamai (UAB „Biocentras“ kolekcijos registracijos numeris B-94-6N) buvo išskirtas Kaliningrado srityje Rusijoje iš sunkiaisiais naftos produktais užteršto juodžemio.

Ląstelės. Ląstelių forma ir dydis kinta priklausomai nuo kultūros amžiaus ir augimo sąlygų, gali būti nuo kokių (0,5 – 0,7µm skersmens) iki lazdelių (0,6-0,8 x 1,2-

1,6 μm dydžio) formos. Kultūroje ląstelės nevienodo dydžio. Ląstelės judrios, pagal Gramą dažosi variabiliai.

Kolonijos. Ant standžios mitybinės terpės po 24 val. išauga 1-2 mm skersmens lygiu paviršiumi iškilios, blizgios, neperšviečiamos, balkšvos lygiais kraštais kolonijos.

Fiziologinės-biocheminės savybės. Tai aerobas. Katalazės reakcija teigiama, oksidazės ir ureazės – neigiama. Rūgščiai neatspari kultūra. Kamienui augti optimali temperatūra 30 – 40 °C ir pH 4,5-9,0. Krakmolo ir želatinos nehidrolizuoja. Kaip anglies ir energijos šaltinį naudoja gliukozę, fruktozę, galaktozę, sacharozę, ksilozę, etanolį, acetatą, citratą, L-alaniną, L-fenilalaniną, D/L arginą, kai kuriuos angliavandenilius, naftą ir jos produktus, riebalus.

Remiantis 16S rDNR geno analize, šis mikroorganizmas artimiausias *Acinetobacter* sp. genčiai, pavaizduotai SEQ ID Nr. 2.

***Acinetobacter* sp. N3** štamai (UAB „Biocentras“ kolekcijos registracijos numeris B-92-11AA) buvo išskirtas Norvegijoje iš NT.

Ląstelės. Ląstelių forma ir dydis kinta priklausomai nuo kultūros amžiaus ir augimo sąlygų kinta nuo kokių iki tiesių ar netaisyklingos formos lazdelių (0,6x2,0 μm dydžio). Ląstelės judrios, pagal Gramą dažosi silpnai teigiamai, nors senstant kultūrai ląstelės tampa gramneigiamos.

Kolonijos. Po 48 val. ant standžios mitybinės terpės išauga balsvos, blizgančios, lygiu paviršiumi, apvalios 1 - 3 mm skersmens kolonijos.

Fiziologinės-biocheminės savybės. Tai aerobas, optimali augimo temperatūra 20-30 °C, pH 6,4-7,0. Oksidazės reakcija neigiama, katalazės - teigiama. Kaip anglies ir energijos šaltinį naudoja ksilozę, galaktozę, fruktozę, acetatą, L-alaniną, DL-arginą, tviną-80, kai kuriuos aromatinius ir alifatinius angliavandenilius, naftą ir naftos produktus. Gliukozę asimiliuoja silpnai, želatinos neskystina, denitrifikacija nevyksta, ureazės reakcija teigiama.

Remiantis 16S rDNR geno analize, šis mikroorganizmas artimiausias *Acinetobacter* sp. genčiai, pavaizduotai SEQ ID Nr. 3.

NT geriausiai skaido šie NOM: *Acinetobacter* sp. NJ9, *Acinetobacter* sp. NJ5 mikroorganizmų štamai. Šiomis savybėmis taip pat pasižymi ir NT emulguojantis *Acinetobacter* sp. N3. Šių mikroorganizmų štamai deponuoti UAB „Biocentras“ mikroorganizmų kolekcijoje. Jų charakteristikos yra:

Acinetobacter sp. NJ9 štamai (UAB „Biocentras“ kolekcijos registracijos numeris B-96-2N) buvo išskirtas iš nafta užteršto vandens telkinio prie Rusijos Tiumenės srities Neftejugansko miesto.

Ląstelės. Pavienių ar sukibusių poromis kokių ($0,5\ \mu\text{m}$) ir lazdelių ($0,5 \times 2,0\ \mu\text{m}$) formos, lazdelės gali sudaryti netikrą micelį ar būti išsidėsčiusios V ir W konfigūracija. Pagal Gramą dažosi nepastoviai, kultūra sudaryta iš gramteigiamų ir gramneigiamų ląstelių. Ryškiai išreikštas ciklas kokai - lazdelės - kokai. Ląstelės yra judrios.

Kolonijos. Ant standžios mitybinės terpės po 48 val. išauga $1,0 - 3,0\ \text{mm}$ skersmens, lygiu paviršiumi iškili, blizgančios peršviečiamos ir fluorescuojančios pilkšvai balsvos, pastos konsistencijos kolonijos.

Fiziologinės-biocheminės savybės. Tai aerobas, katalazės reakcija teigiama, oksidazės - neigiama, optimali augimo temperatūra $25-30\ ^\circ\text{C}$, optimalus pH $5,5-7,0$. NJ9 kamienas hidrolizuoja krakmolą, celiuliozės ir želatinos nehidrolizuoja. Kaip anglies ir energijos šaltinį naudoja gliukozę, ksilozę, galaktozę, maltozę, gliceriną, etanolį, tviną-80, natrio acetatą, L-alaniną, kai kuriuos alifatinius ar aromatinius angliavandenilius, naftą ir jos produktus.

Remiantis 16S rDNR geno analize, šis mikroorganizmas artimiausias *Acinetobacter sp.* genčiai, pavaizduotai SEQ ID Nr. 4.

Acinetobacter sp. NJ5 štamai (UAB „Biocentras“ kolekcijos registracijos numeris B-96-1N) buvo išskirtas iš nafta užteršto molio prie Rusijos Tiumenės srities Neftejugansko miesto.

Ląstelės. Kultūra pleomorfinė, vystymosi ciklas (kokai- lazdelės – kokai) priklauso nuo terpės sudėties, augimo temperatūros bei aeracijos. Kokių skersmuo $0,7 - 0,9\ \mu\text{m}$, lazdelės $0,7-1,1 \times 1,1-1,7\ \mu\text{m}$ dydžio. Lazdelės yra judrios. Pagal Gramą dažosi nepastoviai, kultūra sudaryta iš gramteigiamų ir gramneigiamų ląstelių.

Kolonijos. Ant standžios mitybinės terpės po 48 val. išauga $2,0 - 4,0\ \text{mm}$ skersmens lygiu paviršiumi iškili, silpnai blizgios, balkšvos lygiais kraštais kolonijos, kurių konsistencija yra pastos pavidalo.

Fiziologinės-biocheminės savybės. Tai aerobas. Katalazės reakcija teigiama, oksidazės, metilo raudonojo ir Voges-Proskauer testų – neigiama. Rūgščiai neatspari. Optimali augimo temperatūra $20-30\ ^\circ\text{C}$ ir pH $7,0-7,5$. Celiuliozės neskaido, krakmolo ir želatinos nehidrolizuoja. Kaip anglies ir energijos šaltinį naudoja gliukozę,

ksilozę, galaktozę, laktozę, L-alaniną, kai kuriuos angliavandenilius, naftą ir jos produktus, riebalus.

Remiantis 16S rDNR geno analize, šis mikroorganizmas artimiausias *Acinetobacter* sp. genčiai, pavaizduotai SEQ ID Nr. 5.

Užterštos aplinkos parametrų įvertinimas, NT cheminės prigimties ir kiekio nustatymas

NT patekus į aplinką, pirmiausia pagal standartines procedūras išanalizuojama jų cheminė prigimtis, kiekis ir užterštos aplinkos parametrai. Gauti duomenys perduodami į ES, kurios veikimas apima pradinės NT sudėties bei aplinkos parametrų įvertinimą, NT šalinimo būdo, NEM ir NOM derinių parinkimą, šiuos derinius sudarančių mikroorganizmų optimalių koncentracijų parinkimą, optimalių NT atskyrimo ir biodegradavimo parametrų parinkimą bei tinkamiausių augalų rūšių parinkimą fitoatstatymui. Sprendimų priėmimo valdymo proceso pagalba ES modulyje tarpusavyje yra apdorojami ir susiejami pagrindiniai geografiniai, geologiniai, NT pobūdžio ir kiekio, klimatiniai ir užterštos aplinkos pobūdžio ir kt. duomenys (1 lentelė).

ES taip pat apdoroja duomenų bazėse kaupiamą informaciją apie NT valymui reikalingus materialiuosius, logistinius ir žmogiškuosius išteklius bei įvertina finansines išlaidas ir nuostolius.

Po pirminių NT valymo parametrų įvertinimo, ES parenka biopreparatų sudėtis bei NT valymo technologinius ir biodegradavimo parametrus.

1 lentelė. Aplinkos įvertinimo ES moduly principinis pavyzdys

	NT šalinimas in situ	NT šalinimas ex situ	Teršalų kiekis								Teršalai degė		Teršalų rūšis				Klimatas	Drėgmė		Užterštos aplinkos pobūdis							
			Iki 1 t	Iki 5 t	Iki 10 t	Iki 20 t	Iki 50t	Iki 100 t	Iki 10 000 t	Iki 50 000 t	Taip	Ne	Benzinas	Dyzelinas	Nafta	Kitos		Cheminė sudėtis	Šaltas	Vidutinis	Karštas	Pakankama	Nepakankama	Smėlis	Molis	Priemolis	Sūrus vanduo
Miestas-gyvenvietė	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A22	A24	A25	A26	A27
Technologinis gruntas	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27
Dirbama žemė	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27
Rekreacinė zona	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27
Draustinis	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27
Vandenynas	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27
Jūra	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22	G23	G24	G25	G26	G27
Jūros pakrantė	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	I17	I18	I19	I20	I21	I22	I23	I24	I25	I26	I27
Upė	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20	J21	J22	J23	J24	J25	J26	J27
Upės pakrantė	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K20	K21	K22	K23	K24	K25	K26	K27
Technologiniai vandenys	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27

NEM įvertinimas

Dirvožemis dėl savo struktūros ypatumų gali sorbuoti į jį patekusius NT. Sorbcijos geba priklauso nuo grunto tipo ir nuo NT frakcinės sudėties. Tam yra naudojamos BKPAM, kurios padidina NOM bioprieinamumą prie NT ir tokiu būdu pagreitina naftos angliavandenilių skaidymo procesą.

Viena iš svarbiausių BKPAM savybių yra gebėjimas sumažinti paviršiaus įtempį tarpfaziniame paviršiuje. NEM štamai atskirai buvo auginami skystoje mitybinėje terpėje. Po 16 val. NEM kultūrinio skysčio paviršiaus įtempis matuotas tenziometru 21 °C temperatūroje (2 lentelė).

2 lentelė. BKPAM produkujančių mikroorganizmų įvertinimas pagal paviršiaus įtempį

Eil. Nr.	Kamienas	Paviršiaus įtempimas, mN/m
1	<i>Acinetobacter</i> sp. N3	32,7
2	<i>Acinetobacter</i> sp. Pr82	34,0
3	<i>Pseudomonas</i> sp. NJ13	24,8

NOM įvertinimas pagal skirtingos sudėties ir struktūros naftos angliavandenilių skaidymą

NT sudarantys angliavandeniliai pagal jų molekulėse esančių anglies atomų skaičių skirstomi į lengvuosius (C_6 - C_{10}), vidutinio sunkumo (C_{10} - C_{28}) ir sunkiuosius (C_{28} - C_{40}) (3 lentelė).

3 lentelė NT suskaidymas su NOM

Eil. Nr.	Mikroorganizmai	NT suskaidymo laipsnis, % po 24 val.				
		Nafta	Vidutinių frakcijų distiliatas	Sunkiųjų ir vidutinių frakcijų distiliatų mišinys	Dyzelinas	Mazutas
1	<i>Acinetobacter</i> sp. N3	65,3	68,5	38,5	71	30,9
2	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ5	46,8	52,5	40,9	56,2	20,9
3	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ9	40,6	45,7	31,5	47,4	15,0

Tokios struktūros naftos angliavandenilių daugiausia aptinkama esant „senai taršai“.

NT angliavandenilių skaidymo laipsniui įtakos taip pat turi ir jų erdvinė struktūra. (4 lentelė).

4 lentelė. Skirtingos erdvinės struktūros sunkiųjų NT skaidymas su NOM

Eil. Nr.	Mikroorganizmai	Suskaidymo laipsnis, %		
		Nešakoti angliavandeniliai po 48 val.	Šakoti Angliavandeniliai po 48 val.	Aromatiniai angliavandeniliai po 72 val.
		Heksatriakontanas	Skvalanas	Pirenas
1	<i>Acinetobacter</i> sp. N3	30,1	30,9	14,3
2	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ5	46,1	54,5	18,9
3	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ9	34,0	43,6	10,1

NT skaidymas grunte

Skirtingo tipo grunte buvo įvertintas pavienių NOM gebėjimas skaidyti NT (5 lentelė).

5 lentelė. Naftos:mazuto (1:1) mišinio skaidymas pavieniais NOM skirtingo tipo dirvožemiuose.

Eil. Nr.	Mikroorganizmai	Suskaidymo laipsnis, % po 6 savaičių		
		Priemolis	Molis	Smėlis
1	<i>Acinetobacter</i> sp. N3	43,1	38,8	35,2
2	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ5	52,3	32,2	43,6
3	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ9	37,5	47,9	49,2

Skirtingo tipo grunte taip pat buvo įvertintas NT skaidymas NOM ir NEM deriniais (6 lentelė)

6 lentelė. Naftos:mazuto (1:1) mišinio skirtingo tipo grunte skaidymas NEM ir NOM deriniais

Eil. Nr.	NOM	Suskaidymo laipsnis, % po 6 savaičių								
		Priemolis			Molis			Smėlis		
		NEM			NEM			NEM		
		N3	Pr82	NJ13	N3	Pr82	NJ13	N3	Pr82	NJ13
1	<i>Acinetobacter</i> sp. N3	56,1	49,5	50,8	51,6	46,0	53,3	55,6	60,0	47,3
2	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ5	77,0	55,4	58,7	60,1	44,4	41,7	64,0	81,4	78,7
3	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ9	56,5	44,7	51,9	50,8	55,3	60,8	72,1	64,9	52,4

NT skaidymas gélame vandenyje

NT skaidymas gélame vandenyje buvo atliekamas naudojant NOM kultūras. Visi mikroorganizmai efektyviau skaidė naftą, lyginant su mazutu (7 lentelė).

7 lentelė. Naftos ir mazuto (1:1) skaidymas su NOM gélame vandenyje

Eil. nr	NOM	Suskaidymo laipsnis, % po 3 parų	
		Gėlas vanduo	
		Nafta	Mazutas
1	<i>Acinetobacter</i> sp. N3	71,2	60,4
2	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ5	55,4	54,3
3	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ9	59,6	43,4

NT skaidymas sūriame vandenyje

Sūraus vandens valymas nuo NT taip pat buvo atliekamas naudojant NOM kultūras (8 lentelė).

8 lentelė. Naftos ir mazuto (1:1) skaidymas su NOM jūrų ir vandenynų vandenyje

Eil. nr	Mikroorganizmai ir jų mišiniai	Suskaidymo laipsnis, % po 4 parų			
		Jūros 3,5 ‰		Vandenyno 35 ‰	
		Nafta	Mazutas	Nafta	Mazutas
1	<i>Acinetobacter</i> sp. N3	54,8	45,2	31,6	26,7
2	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ5	39,7	38,4	13,3	21,4
3	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ9	38,0	25,2	27,6	24,2

Biopreparatų kompozicijos parinkimas

Šalia pirminių NT valymo duomenų į ES yra įvedami NEM ir NOM gebėjimo šalinti NT duomenys skirtingo tipo grunte ir skirtingo druskingumo vandenyse. ES sprendimų priėmimo valdymo proceso pagalba šiuos duomenis įvertina ir remiantys gautais rezultatais parenka tinkamiausius NEM ir NOM derinius.

Augalų rūšių fitoatstatymui parinkimas

NT šalinimo etapas naftos angliavandenilius biodegraduojančiais NEM ir NOM deriniais yra baigiamas, kai NT koncentracija sumažėja iki 25 g /kg grunto. Likutinei naftos taršai šalinti yra naudojamas fitoatstatymas. Šio proceso metu gali

būti naudojami pavieniai augalai: rausvieji dobilai (*Trifolium pratense* L.), motiejukai (*Phleum pratense*), svidrės (*Lolium perenne*); arba jų deriniai.

NT valymo procesas nutraukiamas, kai naftos angliavandenilių koncentracijos neviršija aplinkosauginių reikalavimų. Visi gauti duomenys nukreipiami į ES.

NT valymo proceso valdymas

ES, apdorodama visus esamus ir naujai įvedamus NT šalinimo technologinius parametrus, parenka optimaliausią NT šalinimo technologinį scenarijų konkrečiam aplinkos objektui ir kontroliuoja NT šalinimo eigą. Jeigu NT šalinimo eiga neatitinka parinkto scenarijaus, pastarasis iškart keičiamas kitu, labiau tinkančiu, pasiekti maksimalų NT šalinimo laipsnį.

Kuomet NT koncentracijos tenkina aplinkosauginius reikalavimus, ES parengia galutinę NT šalinimo ataskaitą, įvertinančią ne tik NT valymo proceso eigą, bet ir jo kaštus.

Kompleksinis grunto valymas nuo NT *in situ*

Į ES įvedami šie duomenys:

- užterštos žemės plotas - 10 ha;
- grunto tipas – priemolis;
- vidutinė grunto temperatūra – 20 °C;
- grunto drėgmė – 20 %;
- grunto pH=7,2;
- NT koncentracija grunte - apie 162 g /kg;
- NT cheminė sudėtis: sočiųjų junginių – 68 %, aromatinių junginių – 14 %, dervų – 8 %, asfaltenu – 10 %.

ES, apdorojusi esamus ir įvestus duomenis, parinko šį NT šalinimo technologinį scenarijų:

- NEM štamas *Pseudomonas* sp. NJ13; NOM - *Acinetobacter* sp. N3;
- NEM ir NOM santykis derinyje - 1:2.

- pradinė derinio koncentracija darbinėje suspensijoje - $2,7 \times 10^7$ KSV/mL;
- mitybiniai priedai (N ir P);
- valymo trukmė - iki 18 mėnesių
- numatytas kontrolinių mėginių ėmimo dažnis – 1 kartas/3 mėn.

ES parinktame scenarijuje numatyto, kad NT koncentracijai sumažėjus iki 25 g/kg, pradedamas naudoti grunto fitoatstatymas motiejukų (*Phleum pratense*) ir svidrės (*Lolium perenne*) sėklų mišiniu. NT koncentracijai grunte nukritus iki 2g/kg, nutraukiami NT šalinimo darbai ir parengiama galutinė ataskaita apie NT proceso šalinimo eigą ir jo kaštus

Kompleksinis grunto valymas nuo NT *ex situ*

I ES įvedami šie duomenys:

- naftuoto šlamo kiekis – 1400 t;
- grunto tipas – priemolis;
- naftuoto šlamo drėgmė – 50 %;
- naftuoto šlamo pH=6,8;
- NT koncentracija šlame - apie 285 g /kg;
- NT cheminė sudėtis: C₂₈-C₄₀ NT – 42,5 %, kitos NT frakcijos – 57,5 %.

ES, apdorojusi esamus ir įvestus duomenis, parinko šį NT šalinimo technologinį scenarijų:

1. NT emulgavimas.

- NT atskyrimas plovimo įrenginyje;
- NEM štamai - *Acinetobacter sp. Pr82*;
- NT atskyrimo temperatūra – 45-50 °C;
- emulgavimo suspensijos pH=8,5;
- NT emulgavimas nutraukiamas NT koncentracijai sumažėjus iki 170 g/kg.

2. NT skaidymas.

- NT biodegradavimas atliekamas specialiai įrengtoje NT valymo aikštelėje;
- Pasklidimo sluoksnio storis - 0,4 m;
- NOM štamai: *Acinetobacter sp. NJ5* ir *Acinetobacter sp. NJ9*.
- NOM santykis derinyje - 1:1;
- pradinė derinio koncentracija darbinėje suspensijoje - 5×10^7 KSV/mL;
- mitybiniai priedai (N ir P);
- NT skaidymas nutraukiamas NT koncentracijai sumažėjus iki 25 g/kg.

3. Fitoatstatymas.

- Grunto atkūrimas vykdomas specialiame fitoatstatymo lauke;
- Grunto pasklidimo sluoksnio storis - 0,2-0,3 m;
- arimas ir kultivavimas
- augalai fitoatstatymui – raudonieji dobilai (*Trifolium pratense* L.).
- fitoatstatymas baigiamas NT koncentracijai sumažėjus iki 2 g/kg.

4. Galutinė NT šalinimo ataskaita.

- duomenys apie NT šalinimo eigą;
- duomenys apie NT šalinimo kaštus.

Kompleksinis gėlo vandens telkinio valymas nuo NT

Į ES įvedami šie duomenys:

- užteršto gėlo vandens telkinio plotas – 1 km²;
- vidutinė vandens temperatūra – 18 °C;
- vandens pH=7,1;
- NT koncentracija vandens paviršiuje apie 0,5 g /L;
- NT cheminė sudėtis: dyzelinas.

ES, apdorojusi esamus ir įvestus duomenis, parinko šį NT šalinimo technologinį scenarijų:

- NOM štamai - *Acinetobacter sp. N3*, *Acinetobacter sp. NJ9*;
- santykis derinyje – 2,5:1;

- pradinė derinio koncentracija darbinėje suspensijoje – $1,8 \times 10^6$ KSV/mL;
- valymo trukmė - iki 6 mėnesių;
- kontrolinių mėginių ėmimo dažnis – kas 0,5 mėn.;
- apdorojimo dažnis – 1 kartą/mėn.

ES parinktame scenarijuje numato, kad NT koncentracijai sumažėjus iki 0,4 mg/L, NT valymo darbai nutraukiami ir parengiama galutinė ataskaita apie NT proceso valymo eigą ir jo kaštus.

Kompleksinis sūraus vandens valymas nuo NT

Į ES įvedami šie duomenys:

- avarija naftos siurbimo platformoje;
- naftos kiekis jūroje – 200 t;
- naftos kiekis pakrantėje – 5 t;
- užterštos jūros vandens plotas – 20 km^2 ;
- užterštos pakrantės ilgis – 15 km;
- vandens druskingumas – 8,5 ‰;
- NT cheminė sudėtis: žalia nafta.

ES apdorojusi esamus ir įvestus duomenis parenka šį technologinį NT šalinimo scenarijų:

1. Vandens valymas.

- NOM štamai - *Acinetobacter sp. NJ9*;
- pradinė koncentracija darbinėje suspensijoje – $1,1 \times 10^7$ KSV/m²;
- valymo trukmė - 3 mėn.;
- kontrolinių mėginių ėmimo dažnis – 2 kartai/mėn.;
- apdorojimo dažnis – 2 kartai/mėn.

2. Pakrantės valymas.

- NEM štamas: *Acinetobacter sp.N3*, NOM štamas *Acinetobacter sp. NJ9*;
- santykis derinyje – 1:1;
- pradinė koncentracija darbinėje suspensijoje – $1,3 \times 10^7$ KSV/mL;
- dozavimo tūris – 1 litas/pakrantės ilgio metrui;
- valymo trukmė - 3 mėn.;
- kontrolinių mėginių ėmimo dažnis – 2 kartai per mėn.;
- apdorojimo dažnis – ne rečiau kaip 1 kartą per mėn.

ES parinktuose scenarijuose numato, kad NT koncentracijai sumažėjus iki 0,1 mg/L vandenyje ir – iki 1g/kg pakrantės, NT šalinimo darbai nutraukiami ir parengiama galutinė ataskaita apie NT proceso valymo eigą ir jo kaštus.

SEKOS

<110> UAB „Biocentras“

<120> Kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas

<160> SEQ ID Nr. 1

<211> 1000 bp

<212> 16S rDNR

<213> *Pseudomonas sp. NJ13*

<400> 1

NTCNAGCGNNNNAAGNGAGCTTGCTCCTGGATTCA
 GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA
 GTGGGGGACAACGTTTCGAAAGNAACGCTAATACCGCATA
 CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC
 TATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
 ATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGG
 ATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTNNT
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
 GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATT
 AATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG
 GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGC
 AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG
 TGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
 GGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAG
 GGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
 AGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGA
 TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGNNAGTCCACGCCGTAAACGATGTCNACTA
 GCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTANCGC
 ATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTANGGCCNNAAGGNTAAN
 NTCN.

<110> UAB „Biocentras“
<120> Kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas
<160> SEQ ID Nr. 2
<211> 1000 bp
<212> 16S rDNR
<213> *Acinetobacter* sp. PR82
<400> 2

NANCGNNNNGNTGGTGCTTGCACTATCACTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATNAGTGNNGGA
CAACATTTTCGNNNNNNNNGCTAATAACCGCATACGTCCTACG
GGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATG
AGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA
CCANGGCGACGATCTGTNNCGGGTCTGAGANNANNNTCCG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGGAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTA
ANGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCT
AGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAA
CTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTNATACAGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGATTTACTGNNGCTAAAGNNCGCGTAGGCGGCTA
ATTNAGTCAAATGNGAAATCCCCGAGCTTAAGTTGGGAATT
GCNTTCGATACTGNTTAGCTAGAGTGNGNNANAGNATGGTA
GAATTCCNGGTGTAGCGGNNAATGNGNAGAGATCTGGNN
NNNTACNGANGGNGANGGNNNNNNNNNGNNNTAANNCTG
ACGCTGAAGGNNNGAANNNTGGNGNNNNAANNNNNNNTTA
NNNNCCCTGNNAGTCCA.

<110> UAB „Biocentras“
<120> Kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas
<160> SEQ ID Nr. 3
<211> 1000 bp
<212> 16S rDNR
<213> *Acinetobacter* sp. N3
<400> 3

NANNNCNNNNNTNNNNGCNNNNNNNTANNNNNNNNCN
NNGGNNGGGTGNGTGNNGNNTNNCGTANGNCGTATGCGG
GATTNNNNNCCNTTTCGAGATGTTGTCCCCCACTAATAGGC
NGATTCTAAGCATTACTNACNCGTNNGCCGCTNNGNGNTA
GTGCAAGCNCNCNTCNCNNGCTCGACTTGCNTNNGNTAAG
CCTGCCGCCNNCGTTCNNTCNGNNNCNTGGTCAAACNTNNN
NNNNNCGCCAAANNGGGACTGAGACACGGCCCAGANTNNN
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGA
ACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTA
TGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCTTTTGGT
TAATACCCAAGATGAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCAC
CGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGT
GCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTANAGCGCGCGTA
GGCGGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACT
TGGNAATTGCATTCGATACTGGTTGGCTAGAGTGTGGNAGA
GGNNGNNAGAATTCCAGGTGTAGCGNTGAAATGCNTAGAG
ATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCT
ANCACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGNNGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTAC
TAGCCGTTGGNGCCTTTGAGGCTTTAGTGNCGCAGCTAAC
GCGATANNNAGACNGNNTGGNGNGTACGGTCGCAAGACTA
AAACTCNNNNNNNTT.

<110> UAB „Biocentras“
<120> Kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas
<160> SEQ ID Nr. 4
<211> 1000 bp
<212> 16S rDNR
<213> *Acinetobacter* sp. NJ9
<400> 4

NCANGTCNNNCGGANNNAGGNGNTTGCACCTTATCTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCATTTAG
TGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAC
GTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCT
AAATGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
AGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGA
TGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGGA
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTT
TGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTAGTAC
TAATACTACTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCAC
CGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGT
GCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTA
GGCGGCTTTTTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACT
TGGAATTGCATTGATACTGGGAAGCTAGAGTATGGGAG
AGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGcGTAGAG
ATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCtA
ATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACT
AGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCNCAGCTNACN
NNANAAGNANACCGCCNGGNGNAGNNNNNGNCGNAAGANT
NAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNG.

<110> UAB „Biocentras“
<120> Kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas
<160> SEQ ID Nr. 5
<211> 1000 bp
<212> 16S rDNR
<213> *Acinetobacter* sp. NJ5
<400> 5

NCATGCAAGTCGAGCGGNGTGNNGGTGCTTGCACTATCAC
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTA
TTAGTGGGGGACAACATTTTCGAAAGGAATGCTAATACCGCA
TACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC
GCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGG
GTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAG
AGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC
GGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC
TTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTT
AGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAG
CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG
GGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGgGCGTAAAGCGCGC
GTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTA
ACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGgG
AGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGcGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGNAGCCATCTGGC
NNNACACTGACGCTGANGTGNGAAANCATGGGGAGNAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGNCT
ACNAGCCGTTGGGGCCTTTGNNGCTTTAGTGGNNNNANCN
NNNNNNNNNNNNNACCNNCNGGNANNANNGNCNGNANN
ANTAAANT.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompleksinis naftos teršalų (NT) šalinimo būdas, naudojant NT biodegraduojančių mikroorganizmų derinius (biopreparatus), sudarytus iš naftą emuliuojančio mikroorganizmo (NEM) ir naftą oksiduojančio mikroorganizmo (NOM), besiskiriantis tuo, kad apima šiuos etapus:

- (a) užterštos aplinkos įvertinimą ir NT sudėties bei kiekio nustatymą;
- (b) mikroorganizmų derinio parinkimą iš NEM (*Pseudomonas* sp. *NJ13*, *Acinetobacter* sp. *PR82*, *Acinetobacter* sp. *N3*) ir NOM (*Acinetobacter* sp. *N3*, *Acinetobacter* sp. *NJ9*, *Acinetobacter* sp. *NJ5*), parinkimą tokiu būdu, kad gauti preparatai veiktų plačiose skirtingos cheminės prigimties naftos angliavandenilių koncentracijų ribose bei esant skirtingiems aplinkos parametrams: reljefams, gamtinėms zonoms, temperatūroms, drėgmei ir atmosferos slėgiams;
- (c) NT atskyrimo su NEM;
- (d) NT suskaidymo su NOM;
- e) bakterinės kilmės paviršiaus aktyvios medžiagų (BKPAM) nuo NT atskirto vandens panaudojimą grunto drėkinimui;
- (f) fitoatstatymo panaudojimą likutiniam NT išvalymui.

2. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (b) pakopoje naudojamas biopreparatas yra mišinys iš vieno NEM ir mažiausiai vieno NOM štamų.

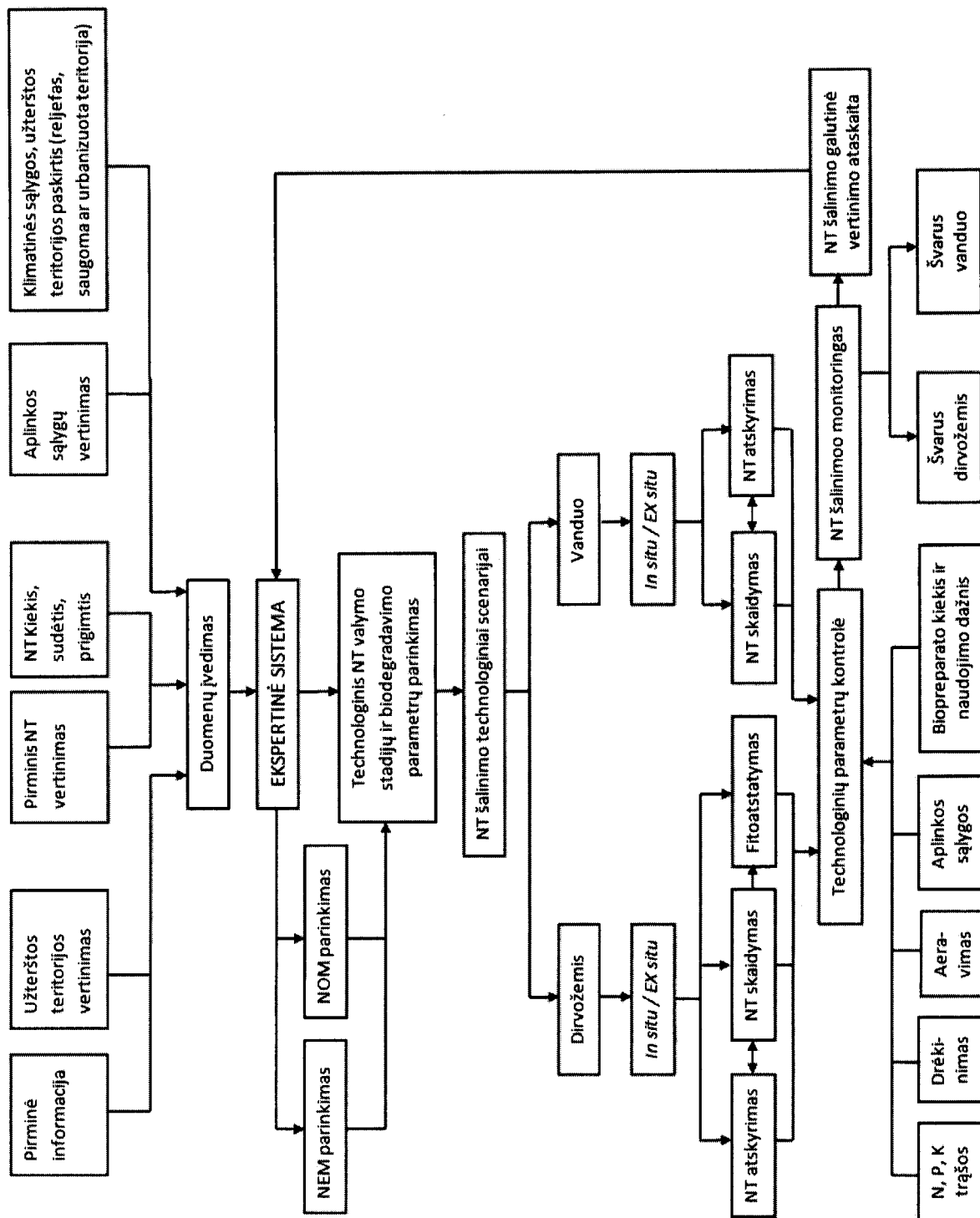
3. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad NT yra skirtingos cheminės prigimties naftos angliavandeniliai: tiesios grandinės, šakoti, aromatiniai angliavandeniliai ir kiti NT junginiai.

4. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal bet kurį 1-3 punktų, besiskiriantis tuo, kad naudojant NEM ir NOM derinius skirtinguose aplinkos objektuose gali būti išvalomi NT koncentracijų ribose nuo maksimalios (~100 %) iki minimalios (~0 %) koncentracijų, bet optimaliausiai - koncentracijų ribose nuo 35 iki 0 %.

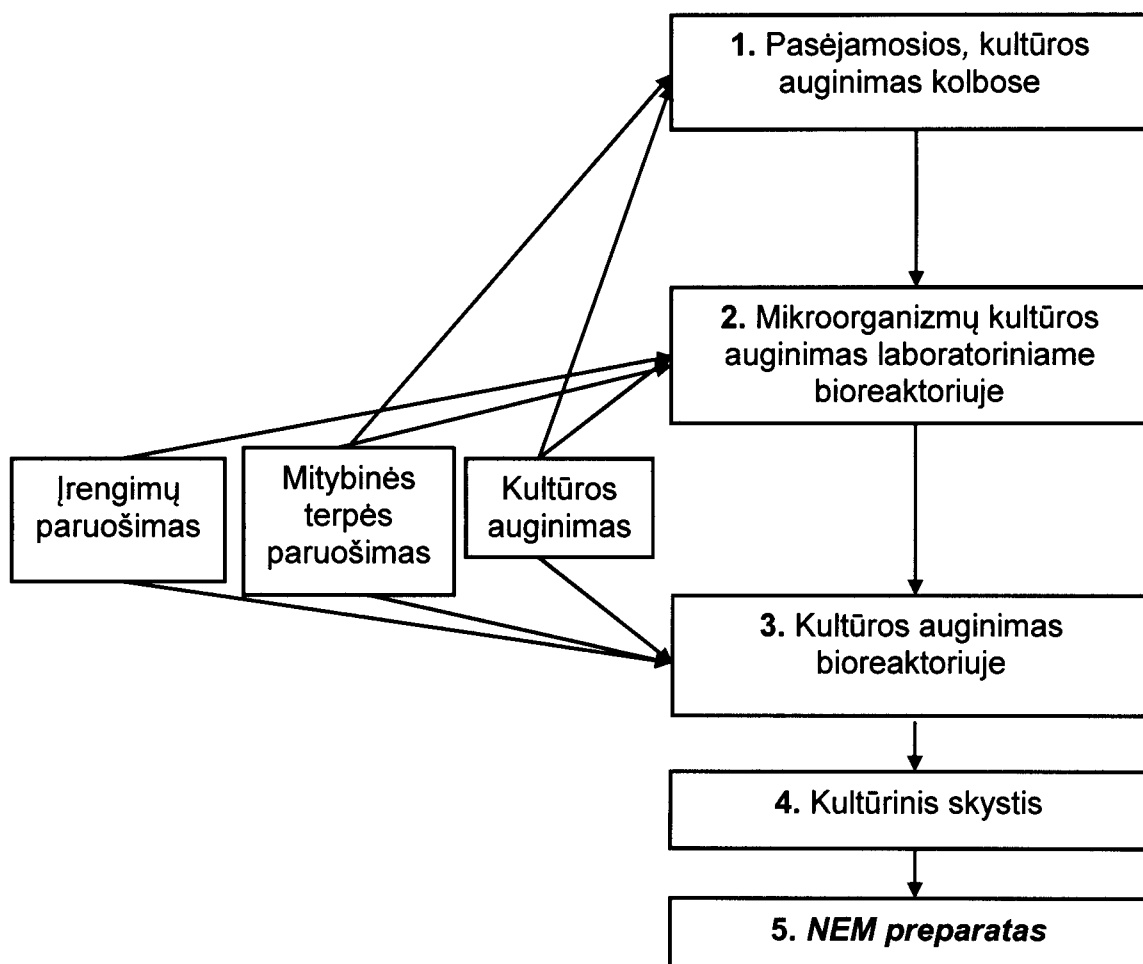
5. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, besiskiriantis tuo, kad NT emulgavimui ir jų oksidavimui yra naudojama sintetinės paviršiaus aktyvios medžiagos (SPAM) derinyje su NOM štamais.
6. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal bet kurį iš 1-5 punktų, besiskiriantis tuo, kad emulgavimui ir oksidavimui yra naudojama BKPAM derinyje su NOM štamais.
7. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad vanduo, panaudotas NT išplovimui iš grunto, gali būti panaudotas to paties grunto drėkinimui, kadangi likusieji NT iš jo pašalinami.
8. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal 5 arba 6 punktą, besiskiriantis tuo, kad bakterinės kilmės ir sintetinių paviršiaus aktyvių medžiagų (PAM) tirpalai gali būti panaudoti daug kartų, prieš tai kaskart nuo jų atskiriant NT.
9. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal bet kurį iš 5-8 punktų, besiskiriantis tuo, kad bakterinės kilmės PAM tirpale yra gyvų NEM ląstelių.
10. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal bet kurį iš 1-10 punktų, besiskiriantis tuo, kad NT emulgavimas atliekamas terpėje pH 6-11 intervale ir 20-90 °C temperatūrų intervale.
11. Kompleksinis NT šalinimas būdas pagal bet kurį iš 1-11 punktų, besiskiriantis tuo, kad NT skaidymas su NOM atliekamas esant pH 2-8,5 intervale ir 4-40°C temperatūrų intervale, geriausiai esant pH=7 ir 30°C temperatūrai.
12. Kompleksinis NT valymo būdas pagal bet kurį iš 1-11 punktų, besiskiriantis tuo, kad minėtas NT šalinimas yra atliekamas *in situ* arba *ex situ*.
13. Kompleksinis NT šalinimo būdas pagal bet kurį iš 1-12 punktų, besiskiriantis tuo, kad NT šalinimas gali būti pradedamas *ex situ* ir po migruojančios NT frakcijos pašalinimo gali būti tęsiamas *in situ*.

14. Kompleksinis NT šalinimas būdas pagal bet kurį iš 1-13 punktų, besiskiriantis tuo, kad po aplinkos valymo nuo NT, panaudojant NEM ir NOM derinius, yra taikomas fitoatstatymas.

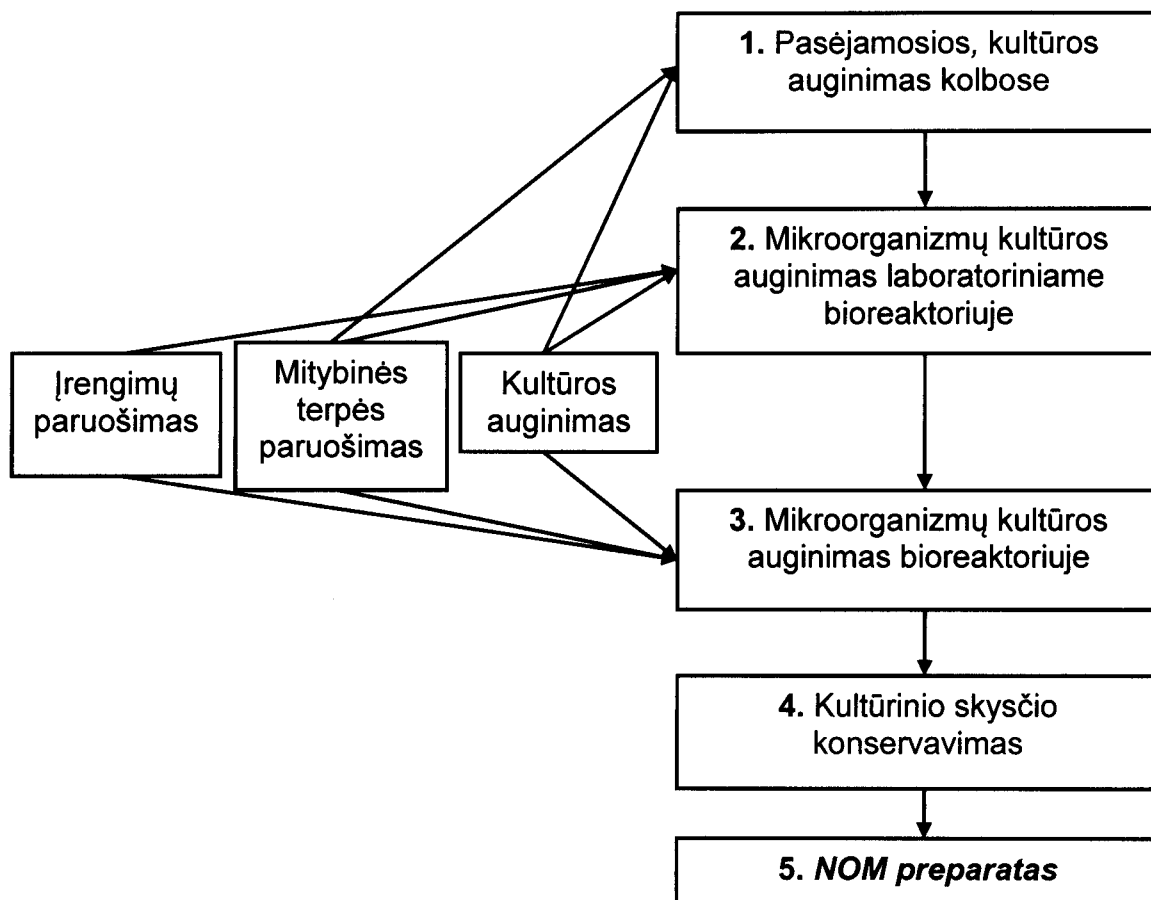
15. Ekspertinė sistema, besiskirianti tuo, kad minėta sistema yra skirta panaudoti kompleksiniam NT šalinimo būdai pagal bet kurį iš 1-14 punktų, bei tuo, kad ji apima: pradinės NT sudėties bei aplinkos parametrų įvertinimą, valymo būdą, panaudojant NEM ir NOM ir jų derinius, jų koncentracijų, išplovimo ir biodegradavimo parametrų parinkimą ir augalų fitoremediacijai parinkimą.



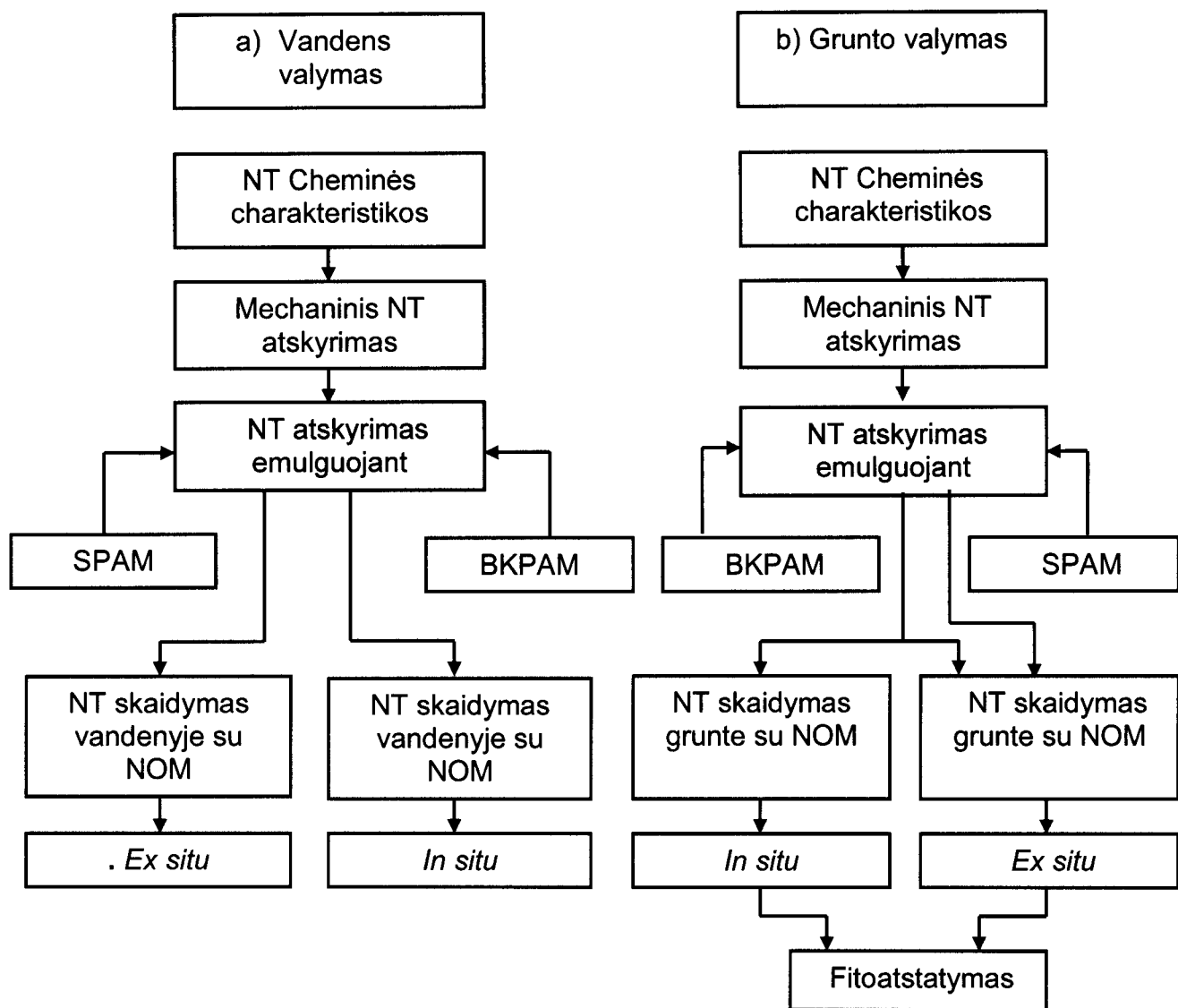
1 pav. NT šalinimo procesų valdymo principinė schema



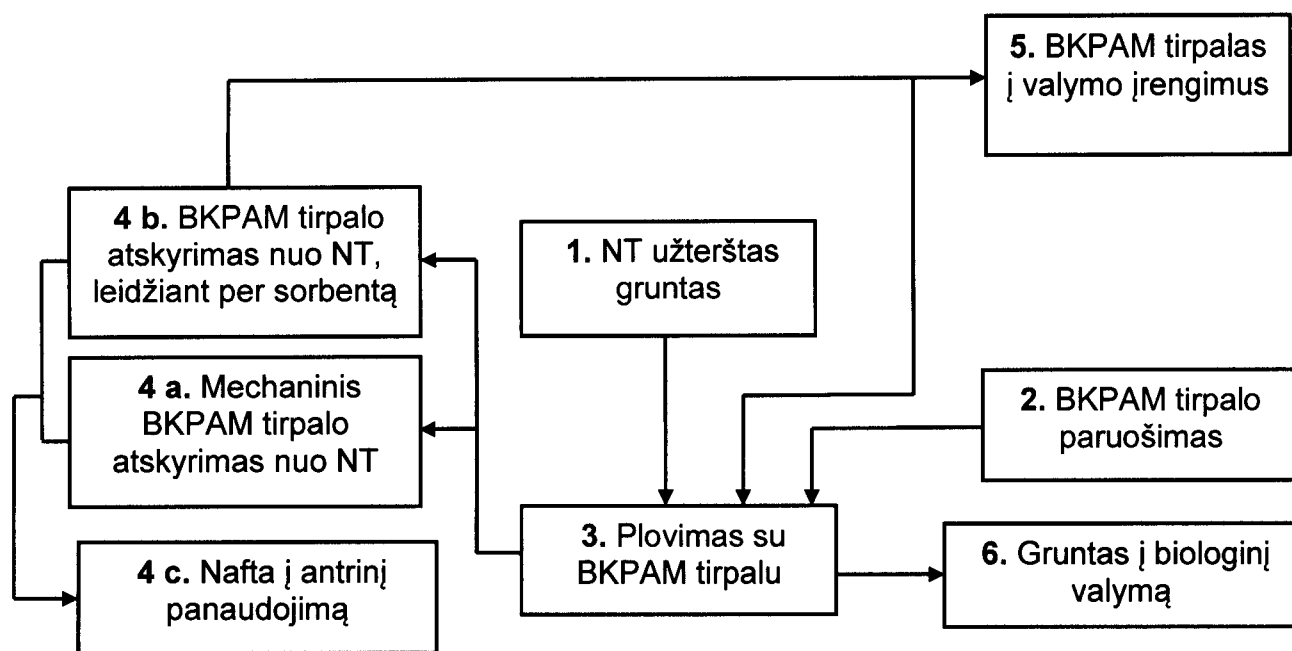
2 pav. NEM paruošimo principinė schema



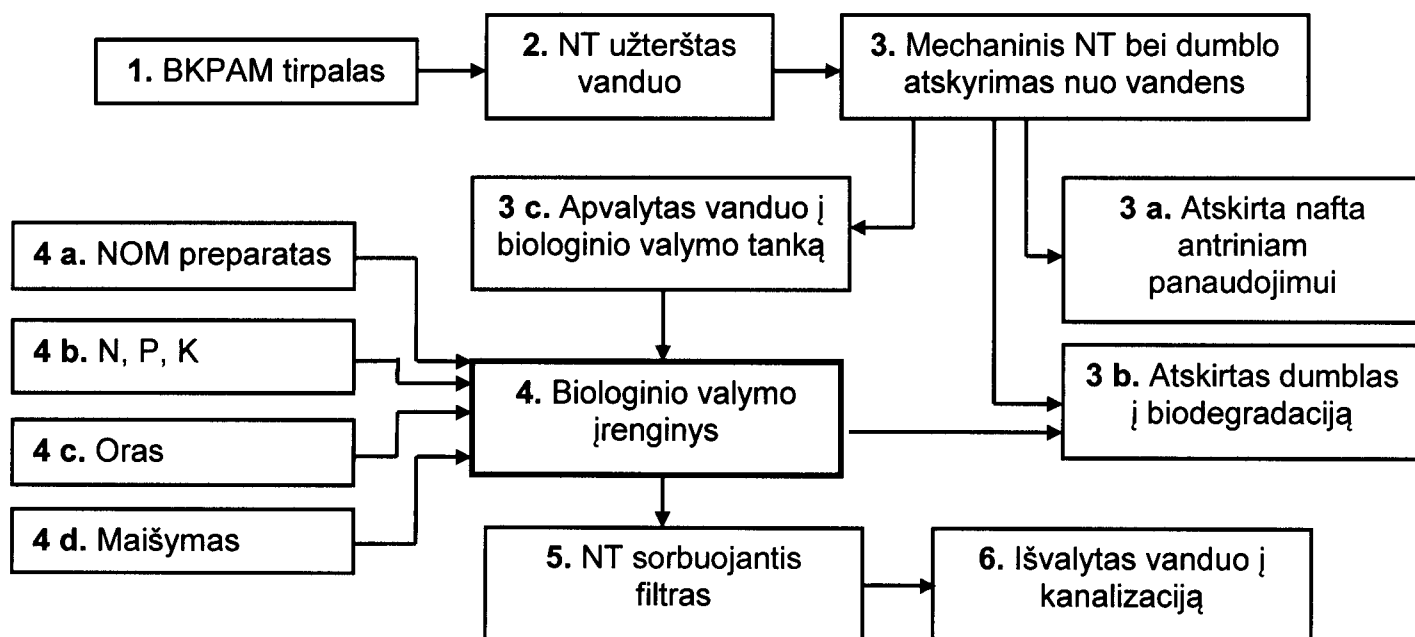
3 pav. NOM paruošimo principinė schema



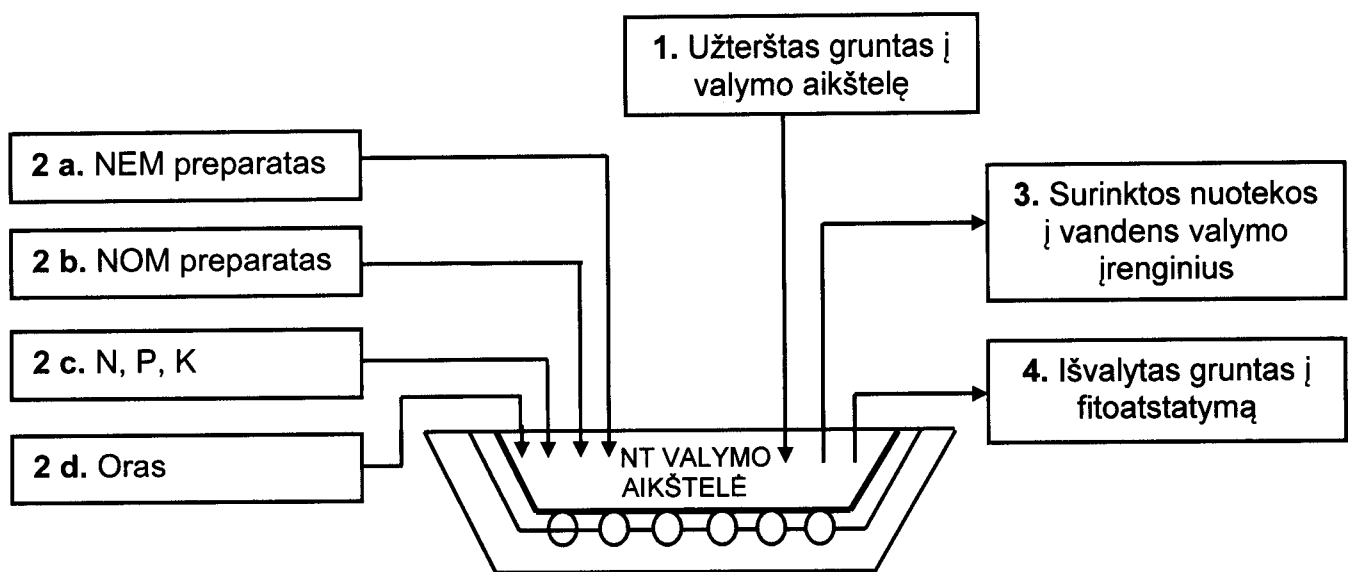
4 pav. Kompleksinio NT valymo iš vandens (a) ir grunto (b) principinės schemos



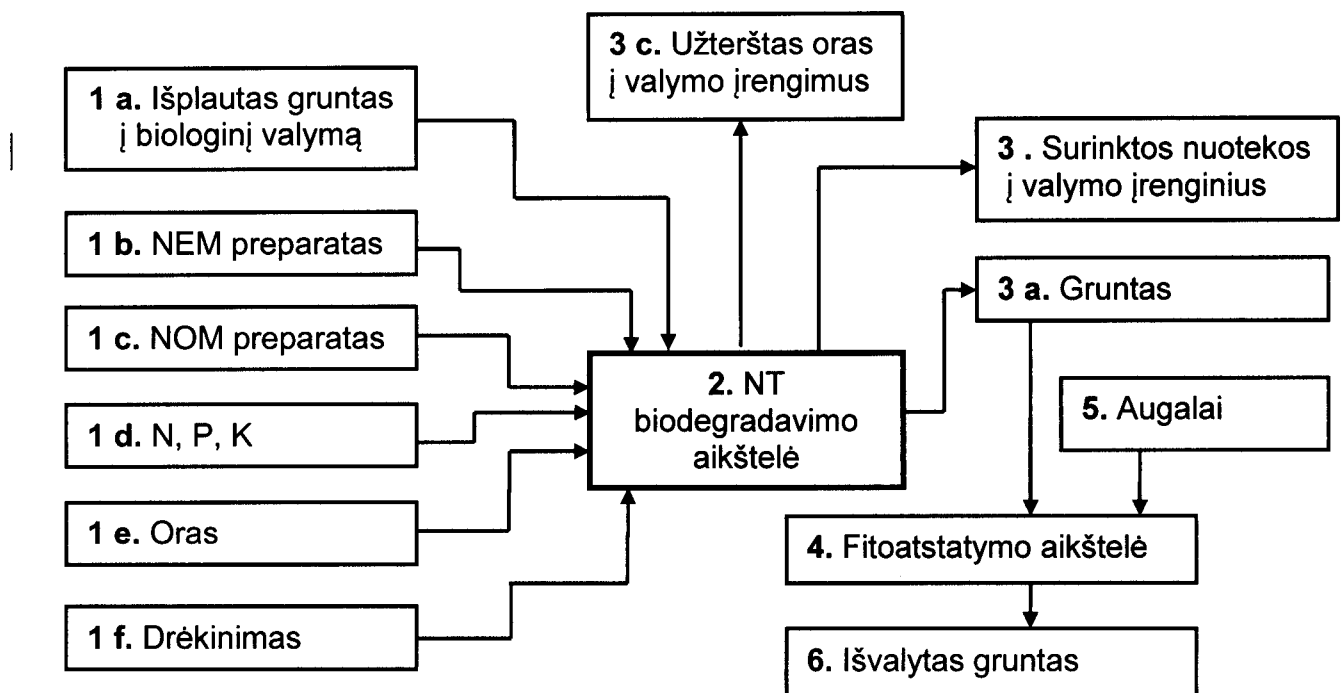
5 pav. NT išplovimo iš užteršto grunto technologinė schema



6 pav. Nafta ir jos produktais užteršto vandens valymo technologinė schema



7 pav. Atviro tipo NT šalinimo iš grunto technologinė schema



8 pav. Kompleksinio NT šalinimo iš grunto biodegradacijos būdu technologinė schema