

(11) **LT 2020 527 A**

(51) Int. Cl. (2021.01): **C02F 3/00**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2020 527**

(22) Paraiškos padavimo data: **2020-06-03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2021-12-10**

(71) Pareiškėjas:

**Klaipėdos universitetas, H. Manto g. 84, 92294
Klaipėda, LT**

(72) Išradėjas:

**Marija KATARŽYTĖ, LT
Tatjana PAULAUSKIENĖ, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Otilija KLIMAITIENĖ, 35, AAA Law, A. Goštauto g.
40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Naftos angliavandenilių skaidymas naudojant grybų kultūras

(57) Referatas:

Išradimas susijęs su naftos angliavandenilių skaidymu jūros vandenyje ir ypač su grybais, gautais iš pakrantės aplinkos, naftos angliavandenilių skaidymui jūrų aplinkoje. Atrinktos grybų padermės imobilizuojamos ant atraminės medžiagos ir jūrinėje aplinkoje kontaktuojamos su naftos angliavandeniliais.

LT 2020 527 A

NAFTOS ANGLIAVANDENILIŲ SKAIDYMAS NAUDOJANT GRYBŲ KULTŪRAS

TECHNIKOS SRITIS

Šis išradimas skirtas naftos angliavandeniliams skaidyti vandenyje, naudojant iš Baltijos pajūrio aplinkos (smėlio ir vandens) išskirtas grybų kultūras.

TECHNIKOS LYGIS

Padidėjęs žaliosios naftos, alternatyviųjų degalų ir jų mišinių gabenimo skaičius Baltijos ir kitose jūrose didina jų krovą naftos terminaluose ir galimų išsiliejimų riziką, šiems produktams patenkant į aplinką. Naftos angliavandeniliai yra vienas iš pagrindinių jūrų ekosistemoms ir žmonių sveikatai kenksmingų taršos šaltinių.

Išsiliejusių naftos angliavandenilių plitimą veikia hidrometeorologiniai parametrai (temperatūra, vėjo greitis, bangos, vandens srovės ir kt.) ir naftos plitimas priklauso nuo angliavandenilių tipo bei lakiųjų frakcijų – mažos molekulinės masės alkanų ir monoaromatinių angliavandenilių – išgaravimo laipsnio (McGenity et al., 2012). Išsilieję angliavandeniliai sudaro plėvelę, kuri formuoja lašelius ir jie išsisklaido vandens storumėje – dėl to pagerėja angliavandenilių biologinis skaidymasis ir naftos angliavandenilių komponentų tirpumas vandenyje. Neramios jūros sąlygomis angliavandeniliuose susidaro vandens emulsija, kitaip vadinama šokolado putėsiais (angl. *chocolate mousse*), kurios didelis klampumas ir mažas paviršiaus plotas sunkina angliavandenilių skaidymąsi.

Fotooksidacija yra dar vienas naftos angliavandenilių irimo procesas, kurio metu angliavandeniliai, o ypač policikliniai aromatiniai, reaguoja su deguonimi veikiami saulės spindulių. Dėl šios priežasties atsiranda struktūrinių pokyčių, dėl kurių gali padidėti angliavandenilių tirpumas arba biologinis skaidymasis vandenyje.

Tuo tarpu sedimentacijos procesas prasideda tada, kai naftos angliavandeniliai absorbuojasi į vandenyje esančias daleles, nes kitu atveju dėl mažesnio angliavandenilių tankio nei vandens tankis jie pasiskirsto vandens paviršiuje.

Bioremediacija yra vienas iš svarbiausių procesų, kurio metu nafta, ypač nelakieji organiniai naftos angliavandeniliai ir jų produktai, pašalinama iš jūrinės aplinkos.

Pagrindinis mikroorganizmų naudojimo bioremediacijos procese tikslas yra sumažinti ar pašalinti toksines medžiagas iš užterštų vietų įvairiais būdais, tokiais kaip skaidymas, asimiliacija ar transpiracija atmosferoje, gaunant netoksiškus galutinius produktus, tokius kaip neorganinės molekulės, vanduo, anglies dioksidas ir mikroorganizmų biomasė. Dėl biologinės kilmės, lyginant su cheminėmis aktyviosiomis paviršiaus medžiagomis, mikroorganizmai turi tam tikrų pranašumų, pavyzdžiui, geresnis biologinis suderinamumas ir biologinis skaidomumas, sumažėjęs toksiškumas, aktyvumas ir stabilumas ekstremaliomis temperatūros, pH ir druskingumo sąlygomis.

Didžiausias bioremediacijos naudojimo pranašumas yra susijęs su aplinka. Tai ekologiškas ir tvarus procesas, beveik neturintis jokio kenksmingo šalutinio poveikio, kurio metu teršalai nėra perkelti į kitas aplinkos terpes. Be to, valomas plotas gali būti didesnis, nei naudojant kitas išsiliojusią teršalų valymo technologijas, nes valymas vyksta judant naftos dėmei, o tai leidžia pasiekti ir tas vietas, kurios kitu atveju būtų neprieinamos. Taikant *in situ* (palyginti su *ex situ*) metodą, susidaro mažiau antrinių atliekų, sumažėja teršalų pernešimo tarp terpių galimybė ir užterštos terpės poveikio žmonėms pavojus. Be to, bioremediacija *in situ* dažnai kainuoja mažiau nei kitos technologijos, nes procesui reikia minimalių priemonių ir mažiau energijos.

Mikroorganizmų naudojimas naftos angliavandeniliams skaidyti turi potencialo, nes mikroorganizmų fermentai ne tik skaido, bet ir naudoja įvairius angliavandenilius kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį.

Mikroorganizmų biologiniam skaidymui įtakos gali turėti šie aplinkos veiksniai: temperatūra, pH, deguonis ir maistinių medžiagų kiekis. Biologinis skaidymas priklauso nuo mikroorganizmų katabolinio aktyvumo, nuo jų gebėjimo produkuoti naujas medžiagas dėl genetinių pokyčių arba nuo specifinių fermentų indukavimo. Taip pat biologinio skaidymo intensyvumas priklauso nuo mikroorganizmų, galinčių skaidyti teršalus, gausumo. Kai sąlygos mikroorganizmams yra palankios, biologinis skaidymas pasiekia maksimalų greitį.

Maistinės medžiagos, įskaitant azotą ir fosforą, yra svarbūs sėkmingo teršalų biologinio skaidymo komponentai. Anglis gaunama iš organinių šaltinių (naftos angliavandenilių); vandenilis ir deguonis imamas iš vandens (Kalantary et al., 2014). Išsiliojus naftai jūros ir gėlo vandens aplinkose, padidėja anglies kiekis ir sumažėja azoto bei fosforo kiekis, kas gali turėti įtakos biologinio skaidymo procesui. Druskėto vandens aplinkoje azoto ir fosforo kiekiai yra maži, todėl siekiant suintensyvinti teršalų bioremediacijos procesą, būtina papildomai pridėti maistinių medžiagų (Atlas, 1995; Head, Swannell, 1999). Jūrinėje aplinkoje labai svarbu pridėti ir biostimuliatorių, kurie turėtų būti nukreipti į mikroorganizmus, esančius naftos lašeliuose, ir kurie nebūtų lengvai praskiedžiami bei išplaunami esant didesniai bangavimui.

Didžiausias naftos angliavandenilių skaidymo greitis jūros ir gėlo vandens aplinkose pasiekiamas esant 20–30 °C ir 15–20 °C temperatūroms atitinkamai.

Iš jūros ar dirvožemio aplinkos išskirti mikroorganizmai, pavyzdžiui, bakterijos, grybai ir mielės, geba skaidyti įvairius angliavandenilių junginius ir yra naudojami biologinio valymo procesuose.

Iki šiol atliktuose tyrimuose buvo tirtas jūrinių grybų naudojimas bioremediacijos procese naftos angliavandeniliams skaidyti, kiekybiškai įvertinant naftos angliavandenilių masės pokyčius laike arba naftos angliavandenilių junginių, įskaitant tiesios grandinės n-alkanų, šakotos grandinės alkanų (pvz., pristano ir fitano) bei policiklinių aromatinių angliavandenilių, kiekio pokyčius. Grybai

geba suskaidyti struktūriškai skirtingą naftos angliavandenilių diapazoną įvairiais mechanizmais, įskaitant viduląstelinius ir tarpląstelinius fermentus.

Į vandenį patekę angliavandeniliai linkę plisti – dėl vėjo ir bangų poveikio koncentruotis vienoje vietoje: sudaryti vandens ir naftos angliavandenilių arba naftos angliavandenilių ir vandens putų (angl. *foam*) pavidalo emulsijas (Colwell et al., 1977). Mikroorganizmų naudojimo naftos angliavandeniliams skaidyti procese taip pat svarbu yra pačių mikroorganizmų emulsijos suformavimas.

Bakterijos ir grybai patys gamina biologiškai veiklias medžiagas. Dėl biologinės kilmės šios medžiagos, palyginti su cheminėmis aktyviosiomis paviršiaus medžiagomis, turi tam tikrų pranašumų, tokių kaip geresnis biologinis suderinamumas ir biologinis skaidomumas, mažesnis toksiškumas, aktyvumas ir stabilumas ekstremaliomis temperatūros, pH ir druskingumo sąlygomis. Biologiškai aktyvios paviršiaus medžiagos, atsižvelgiant į jų sudedamąsias struktūras, gali būti glikolipidai, fosfolipidai, polisacharidai ir lipidų kompleksai, lipoproteinai ir kryžmiškai sujungtos, hidroksilintos riebalų rūgštys bei visa ląstelės struktūra (Effendi et al., 2018).

Įvairūs grybai yra žinomi kaip svarbūs aukštos molekulinės masės policiklinių aromatinių angliavandenilių skaidytojai sausumoje, metabolizmo procesuose naudojantys fermentų kompleksą (McGenity et al., 2012). Grybų naftos angliavandenilių skaidymas sausumoje yra gerai žinomas procesas, tačiau rūšių įvairovė ir su tuo susiję mechanizmai bei skaidymo būdai dar nėra išsamiai ištirti. Apskaičiuota, kad grybų rūšių įvairovė svyruoja nuo 1,5 iki 3,5–5,1 milijonų. Grybų daugiausia randama sausumoje, bet taip pat aptinkama ir vandens aplinkoje (gėluose vandenyse ir jūrose), tačiau nepaisant savo galimo svarbaus naftos angliavandenilių skaidymo pakrantėse vaidmens, jie vis dar nesulaukia pakankamo dėmesio (McGenity et al., 2012). Turint omenyje platų grybų paplitimą aplinkoje ir jų poveikį naftos angliavandeniliams, grybų naudojimas naftos angliavandeniliams skaidyti turi didelį potencialą biotechnologijose.

Grybų skaidymo mechanizmai yra kitokie nei bakterijų. Skaidymo metu grybai iš savo grybienos išskiria tarpląstelinius fermentus, tad biologinio skaidymo procesas vyksta grybų ląstelių sienelės išorėje. Dėl šio mechanizmo jie gali skaidyti didelės molekulinės masės teršalus ir išvengti jų toksinio poveikio. Grybai yra svarbūs pradiniam naftos angliavandenilių skaidymo etape. Jų fermentai, tokie kaip lignino peroksidazė, mangano peroksidazė, lakazė ir epoksidinė hidrolazė, skirti tokiems junginiams kaip ligninas skaidyti, sėkmingai skaido ir naftos angliavandenilius (McGenity et al., 2012). Fermentų efektyvumas, remiantis jų stipriu oksidaciniu aktyvumu ir mažu substrato specifiškumu, priklauso nuo rūšių ir kamieno, jo oksidacinio mechanizmo, lignoceliuliozės kilmės ir auginimo sąlygų (Galic et al., 2018).

Bioaugmentacija, t. y. mikroorganizmų perkėlimas į užterštas vietas, dažnai laikomas praktiškesniu metodu, palyginti su kitais metodais. Bioaugmentacijos efektyvumas priklauso nuo tinkamo mikroorganizmų biomasės kiekio parinkimo, perkėlimo būdo ir galimos sorbcijos į aplinkines terpes.

Vienas iš perspektyviausių šios srities metodų yra skirtingų nešiklių ar pagalbinių medžiagų naudojimas ląstelėms imobilizuoti, kad ilgą laiką būtų palaikomas pakankamas mikroorganizmų aktyvumas, tokiu būdu užtikrinant didesnę bioremediacijos efektyvumą (Tyagi et al., 2011). Grybai, priklausantys *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* gentims, yra tarp mikroorganizmų, galinčių skaidyti naftos angliavandenilius vandens aplinkoje (Ameen et al., 2016; Al-Hawash et al., 2019; Chulalaksananukul et al., 2006; Al-Hawash et al., 2018). Tačiau, mūsų žiniomis, iki šiol siūlinių (angl. *filamentous*) grybų izoliatai ir jų biologinio skaidymo galimybės vandens aplinkoje buvo tikrinami tik laboratorinėmis sąlygomis, naudojant nedidelius kiekius, ir joks tolesnis naudojimas *ex situ* sąlygomis nebuvo plėtojamas. Svarbiausias grybų izoliatų naudojimo naftos angliavandeniliams vandens aplinkoje skaidyti pagrindimas tas, kad šis metodas yra ekonomiškai ir ekologiškai. Be to, grybų biomasės gamyba, imobilizavimas ir biostimuliatorių, kurie kreipia grybus vandenyje esančių naftos lašelių link, pridėjimas tam, kad grybų biomasė nebūtų lengvai praskiedžiama ar nuplaunama didesnio bangavimo. Taigi, grybų biomasė gali būti išsaugota iki naudojimo laiko ir gali būti naudojama *ex situ* aplinkoje.

TRUMPAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šis išradimas apibūdina grybų biomasės, gautos iš Baltijos jūros pakrantės, naudojimą jūrinėje aplinkoje, kuri buvo užteršta naftos angliavandeniliais avarinio išsiliejimo metu.

Taikant šiame išradime aprašytą iš pakrančių aplinkos išskirtų grybų kultūrų naudojimo metodą, galima sumažinti naftos angliavandenilių kiekį jūros vandenyje. Pavyzdžiui, šis išradimas gali būti naudojamas žaliai naftai, alternatyviems degalams ir jų mišiniams valyti vandens aplinkoje. Be to, pagal šį išradimą, šį metodą taip pat galima taikyti ir siekiant atstatyti gerą vandens telkinių būklę.

Metodas apima tam tikrų grybų rūšių parinkimą ir auginimą, išsiliejimo masto ir cheminės sudėties vertinimą bei laiku naudotinos kompozicijos paveiktoje zonoje nustatymą.

TRUMPAS PAVEIKSLŲ APRAŠYMAS

Išradimo ypatybės pateikiamos ir aprašomos papildomuose punktuose. Tačiau pats išradimas gali būti geriausiai suprantamas remiantis šiuo išsamiau išradimo aprašymu, kuriame pateikiami pavyzdiniai išradimo variantai kartu su paveikslais:

1 pav. *Alternaria rosea* padermė ant vandens agaro terpės T2 ir T8 dienomis.

2 pav. *Clonostachys rosea* padermė ant vandens agaro terpės T4 ir T15 dienomis.

3 pav. *Clonostachys rosea* padermės (*) sekos panašumas su kitų grybų sekomis, nustatytomis iš naftos angliavandeniliais užterštos aplinkos arba naudojamų jos skaidymui (yra BLAST duomenų bazėje). Filogenetinis medis (*Neighbor-Joining* metodas). Atkartotų medžių procentas, kuriame

susieti taksonai sugrupuoti atliekant bootstrap testą (1000 pakartojimų), rodomi šalia šakų. Medis nubraižytas pagal mastelį, o šakų ilgis yra toks pat, kaip ir evoliucijos atstumas, naudojamų filogenetiniam medžiui nustatyti. Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti naudojant maksimalios kompozicinės tikimybės metodą ir yra bazinių pakaitų skaičiaus vienetais vienoje vietoje. Kodono pozicijos buvo 1 + 2 + 3 + nekoduojama. Kiekvienai sekų porai buvo pašalintos visos dviprasmiškos pozicijos (poros ištrynimo galimybė). Filogenetinė analizė atlikta naudojant programinę įrangą MEGA X (Faten et al., 2013).

4 pav. *Emercillopsis* sp. padermės (*) sekos panašumas su grybų sekomis, gautomis iš užterštos naftos angliavandeniliais aplinkos arba naudojamų jos skaidymui (yra BLAST duomenų bazėje). Filogenetinis medis (*Neighbor-Joining* metodas). Atkartotų medžių procentas, kuriame susieti taksonai sugrupuoti atliekant bootstrap testą (1000 pakartojimų), rodomi šalia šakų. Medis nubraižytas pagal mastelį, o šakų ilgis yra toks pat, kaip ir evoliucijos atstumas, naudojamų filogenetiniam medžiui nustatyti. Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti naudojant maksimalios kompozicinės tikimybės metodą ir yra bazinių pakaitų skaičiaus vienetais vienoje vietoje. Kodono pozicijos buvo 1 + 2 + 3 + nekoduojama. Kiekvienai sekų porai buvo pašalintos visos dviprasmiškos pozicijos (poros ištrynimo galimybė). Filogenetinė analizė atlikta naudojant programinę įrangą MEGA X (Faten et al., 2013).

5 pav. *Fusarium equiseti* padermės (*) sekos panašumas su grybų sekomis, gautomis iš užterštos naftos angliavandeniliais aplinkos arba naudojamų jos skaidymui (yra BLAST duomenų bazėje). Filogenetinis medis (*Neighbor-Joining* metodas). Atkartotų medžių procentas, kuriame susieti taksonai sugrupuoti atliekant bootstrap testą (1000 pakartojimų), rodomi šalia šakų. Medis nubraižytas pagal mastelį, o šakų ilgis yra toks pat, kaip ir evoliucijos atstumas, naudojamų filogenetiniam medžiui nustatyti. Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti naudojant maksimalios kompozicinės tikimybės metodą ir yra bazinių pakaitų skaičiaus vienetais vienoje vietoje. Kodono pozicijos buvo 1 + 2 + 3 + nekoduojama. Kiekvienai sekų porai buvo pašalintos visos dviprasmiškos pozicijos (poros ištrynimo galimybė). Filogenetinė analizė atlikta naudojant programinę įrangą MEGA X (Faten et al., 2013).

6 pav. *Penicillium* sp. padermės (*) sekos panašumas su grybų sekomis, gautomis iš užterštos naftos angliavandeniliais aplinkos arba naudojamų jos skaidymui (yra BLAST duomenų bazėje). Filogenetinis medis (*Neighbor-Joining* metodas). Atkartotų medžių procentas, kuriame susieti taksonai sugrupuoti atliekant bootstrap testą (1000 pakartojimų), rodomi šalia šakų. Medis nubraižytas pagal mastelį, o šakų ilgis yra toks pat, kaip ir evoliucijos atstumas, naudojamų filogenetiniam medžiui nustatyti. Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti naudojant maksimalios kompozicinės tikimybės metodą ir yra bazinių pakaitų skaičiaus vienetais vienoje vietoje. Kodono pozicijos buvo 1 + 2 + 3 + nekoduojama. Kiekvienai sekų porai buvo pašalintos visos dviprasmiškos

pozicijos (poros ištrynimo galimybė). Filogenetinė analizė atlikta naudojant programinę įrangą MEGA X (Faten et al., 2013).

7 pav. *Alternaria* sp. padermės (*) sekos panašumas su grybų sekomis, gautomis iš užterštos naftos angliavandeniliais aplinkos arba naudojamų jos skaidymui (yra BLAST duomenų bazėje). Filogenetinis medis (*Neighbor-Joining* metodas). Atkartotų medžių procentas, kuriame susieti taksonai sugrupuoti atliekant bootstrap testą (1000 pakartojimų), rodomi šalia šakų. Medis nubraižytas pagal mastelį, o šakų ilgis yra toks pat, kaip ir evoliucijos atstumų, naudojamų filogenetiniui medžiui nustatyti. Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti naudojant maksimalios kompozicinės tikimybės metodą ir yra bazinių pakaitų skaičiaus vienetais vienoje vietoje. Kodono pozicijos buvo 1 + 2 + 3 + nekoduojama. Kiekvienai sekų porai buvo pašalintos visos dviprasmiškos pozicijos (poros ištrynimo galimybė). Filogenetinė analizė atlikta naudojant programinę įrangą MEGA X (Faten et al., 2013).

Tinkamiausi išradimo variantai bus aprašyti žemiau su nuorodomis į brėžinius. Kiekviename paveiksle yra ta pati to paties ar lygiavertio elemento numeracija.

IŠRADIMO ĮGYVENDINIMO APRAŠYMAS

1. Eksperimente naudojamos grybų padermės

Grybai buvo išskirti iš pietrytinėje Baltijos jūros pakrantėje surinktų vandens ir smėlio mėginių. Toliau buvo testuojami 18 grybų izoliatų ant vandens agaro terpės, jos paviršių padengus 250 mikrolitrų naftos angliavandenilių plėvele. Ši nafta buvo paimta iš naftos telkinio Lietuvoje. Dalis agaro terpės buvo papildyta NaCl druska. Kiekvienas grybų izoliatas (po tris pakartojimus) buvo pasėtas tokiomis sąlygomis:

- a) vandens agaras + NaCl 0,08 % + naftos angliavandeniliai + 50 mikrolitrų grybų suspensijos;
- b) vandens agaras + naftos angliavandeniliai + 50 mikrolitrų grybų suspensijos užpilo;
- c) kontrolė (vandens agaras + NaCl 0,08 % + naftos angliavandeniliai);
- d) kontrolė (vandens agaras + naftos angliavandeniliai).

Petri lėkštelės su grybų izoliatais dvi savaites buvo laikomos inkubatoriuje 20 °C temperatūroje. Aktyvumas buvo matuojamas T2, T4, T6, T8, T15 dienomis. Naftos skaidymo aktyvumas buvo nurodytas remiantis dviem kriterijais: a) vizualiai matomu naftos bioplėvelės pakitimu; b) grybų hifų ilgio pakitimu nuo sėjimo centro (1 pav. ir 2 pav.).

Grybai, kurie pasirodė esantys potencialiai aktyvūs naftos bioplėvelės atžvilgiu, nurodyti 1 lentelėje.

1 lentelė. Grybų izoliatai, kurie pasirodė esantys aktyvūs naftos skaidymo eksperimente

Grybo izoliatas	Aktyvumas skaidant naftos plėvelę	Grybo izoliacijos šaltinis	BLAST numeris
<i>Emericellopsis sp.</i>	vidutinis	jūrinis vanduo	MT457648
<i>Penicillium sp. 1</i>	vidutinis	smėlis	MT457709
<i>Fusarium equiseti 1</i>	stiprus	smėlis	MT457652
<i>Clonostachys rosea</i>	stiprus	smėlis	MT457708
<i>Penicillium sp. 2</i>	vidutinis	smėlis	MT457653
<i>Fusarium equiseti 2</i>	stiprus	smėlis	MT457662
<i>Alternaria alternata</i>	stiprus	smėlis	MT457649
<i>Alternaria rosae</i>	stiprus	smėlis	MT457663

Išskirti DNR pagausinti ITS3 (GCATCGATGAAGAACGCAGC) ir ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) 18S universaliaisiais pradmenimis ir nusiųsti sekoskaitai. Sekoskaitos rezultatų duomenys – DNR sekos – apdorotos naudojantis molekulinės evoliucijos genetikos analizės programine įranga MEGA X ir palygintos BLAST algoritmu su genų duomenų bazėje esamomis sekomis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Remiantis literatūros duomenimis, mūsų ištirtos potencialiai aktyvios grybų rūšys turi skirtingus fermentus, kurie taip pat gali paveikti naftos angliavandenių skaidymą (2 lentelė).

2 lentelė. Remiantis literatūros duomenimis, tiriamoms grybų rūšims ar gentims būdingi fermentai

Grybo izoliatas	Fermentai
<i>Fusarium equiseti</i>	Lakazė, nuo mangano priklausanti peroksidazė (MnP) ir nuo mangano nepriklausanti peroksidazė (MIP)
<i>Clonostachys rosea</i>	MnP, MIP, tarpląstelinė proteazė (PrC), universali peroksidazė (VP)
<i>Alternaria alternata</i>	Lakazė, MnP, lignino peroksidazė (LiP) ir katalazės fermentai
<i>Alternaria rosea</i>	Lakazė, MnP, LiP ir katalazės fermentai
<i>Emericellopsis sp.</i>	Celiulazė, proteazė, amilazė, β -gliukozidazė, lipazė ir laminarinazė
<i>Penicillium sp. 1</i>	Ksilanazė, celiulazė, MnP, LiP ir lakazė
<i>Penicillium sp. 2</i>	Ksilanazė, celiulazė, MnP, LiP ir lakazė

2. Grybų biomasės gamyba, išsaugojimas ir tolesnis naudojimas

Grybų biomasės gamybai siūloma naudoti kviečių, avižų, ryžių, kukurūzų, miežių arba javų šiaudus, kviečių sėlenas ar pjuvenas kietosios fermentacijos sąlygomis. Kieto substrato fermentacijos technologija grįsta grybų auginimu ant kietų atliekų ir yra naudojama biotechnologijose pačių organizmų ir jų šalutinių produktų gamybai. Pjuvenų substratas buvo įvertintas kaip tinkamas gaminti grybo *Fusarium equiseti* lignolitinius fermentus (Nathan et al., 2018). Kviečių šiaudai yra vienas gausiausių pasėlių likučių pasaulyje, ir jie sėkmingai naudojami grybams, turintiems didelį fermentinį aktyvumą (peroksidazėms ir lakazėms), pavyzdžiui, *Clonostachys rosea* arba *Alternaria sp.*, auginti (Galic et al., 2018). Svarbi kviečių šiaudų savybė yra ta, kad juos galima naudoti kaip natūralų sorbentą naftos išsiliejus vandenyje (Paulauskienė, Jucikė, 2015).

Grybų suspensija paruošiama taip: (i) pasėjama 100 ml sintetinės terpės su miceliniais diskais kultūromis, užaugintomis ant bulvių dekstrozės agarų, (ii) inkubuojama rotacinėje purtyklėje (160 aps./min.) kambario temperatūroje (20 ± 2 °C) 7 dienas, (iii) gauta biomasė plaunama steriliu distiliuotu vandeniu; (iv) ji homogenizuojama laboratoriniame maišytuve.

Kietajai fermentacijai santykiu 1:5 kieto substrato (g) reikia sudrėkinti 1:1 (ml) vandens, kaip azoto šaltinį galima pridėti peptono ar mielių ekstrakto. Tada 20 min. autoklavuojama 121 °C temperatūroje ir steriliai pasėjama 1:15 (ml) santykiu micelinės suspensijos (inokuliuoto). Inkubacija turėtų būti atliekama 25 °C temperatūroje, 15 kartų didesnė nei naudotose biomedžiagų tūrio kolbose iki 4–7 dienų.

Paskui kviečių šiaudai, apaugę naudojamų grybų kultūrų grybiene ir konidijomis, turėtų būti išsaugoti liofilizuojant. Biomasė yra džiovinama užšaldant, prieš tai ją sušaldant iki –80 °C temperatūros. Vėliau 20 valandų džiovinama liofilizatoriumi esant 0,2 mbar išoriniam kolektoriaus slėgiui.

Baigus išsaugojimo procesą, liofilizuoti produktai turėtų būti dedami į plastikinius vakuuminius maišus ir iki naudojimo laikomi kambario temperatūroje.

3. Grybų biomasės naudojimas jūrinėje aplinkoje

Kadangi grybų rūšys buvo išskirtos iš pietrytinės Baltijos jūros pakrantės vandens ir smėlio mėginių, tai rodo, kad grybai būtent šiame regione yra natūralios ekosistemos dalis. Todėl naudoti šias konkrečias rūšis naftos angliavandenių bioremediacijai galima, nes tai nedaro jokio kenksmingo šalutinio poveikio aplinkai.

Grybų naudojimo tikslas yra sumažinti žalą, kurią sukelia išsiliejusios naftos skaidymas jūros paviršiuje, kad nepatektų į seklius vandenį ar į krantą. Didžiausią žalą išsiliejusi nafta padaro pasiekusi būtent negilius vandenį ar krantą, užteršdama jautrias buveines ir pakenkdama tose pakrančių vietose gyvenančioms rūšims. Šį metodą būtų galima naudoti ir labai sekliuose

vandenyse, mažesniame nei 5 ar 10 metrų gylyje, ir jis neturėtų neigiamos įtakos jūros dugne gyvenantiems bentosiniams organizmams. Metodas taip pat galėtų būti taikomas ir sudėtingesnei bioremediacijai, kai nafta išsilieja tiesiai virš bentosinių gyvūnų buveinių, koralų, jūržolių, taip pat šalia žuvų veisimosi vietų bei ir seklių žvejybos vietų.

Vyraujantys jūros vandens aplinkos parametrai yra dar vienas veiksnys, į kurį reikia atsižvelgti. Biomasė galėtų būti naudojama naftos angliavandeniliams vandens temperatūroje, aukštesnėje kaip +15 °C, pH intervale nuo 8 iki 9, druskingumo intervale nuo 0,1 iki 8 PSU. Norint, kad naudojama grybų kultūra veiktų, ji turi turėti galimybę patekti tiesiai ant išsiliejusios naftos, naftos produktų ar alternatyvių degalų paviršiaus. Inokuliatas, kietųjų dalelių pavidalu, yra paskirstomas tiesiogiai ant naftos angliavandenilių jį išsklaidant, arba skystas inokuliatas yra purškiamas iš laivo ar orlaivio (su tinkama purškimo ar išsklaidymo įranga) ant vandens paviršiaus naftos išsiliejimo vietoje. Inokuliatas turi būti paskirstomas tokiu būdu, kad galėtų lengvai įsigerti į naftos produktą.

Skystas inokuliatas turėtų būti purškiamas specialiais purkštukais, sumontuotais ant purškimo mechanizmų, kurie yra kelių metrų pločio. Purkštukai turėtų būti išdėstyti taip, kad būtų užtikrintas tolygus medžiagos paskirstymas ant išsiliejusios naftos plotų.

Be to, norint atkurti natūralią nafta užteršto ploto mikroflorą, galima naudoti papildomą specializuotą inokuliata su grybo kultūra, pavyzdžiui, *Emercilopsis sp.*

Literatūros sąrašas

1. R.R. Kalantary, A. Mohseni-Bandpi, A. Esrafil, S. Nasser, F.R. Ashmagh, S. Jorfi, Ja'fari, M. Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. *Iranian J. Environ. Health Sci. Eng.*, 12 (1) (2014), p. 143
2. Dellagnezze B.M., Gomes M.B., de Oliveira V.M. (2018) Microbes and Petroleum Bioremediation. In: Kumar V., Kumar M., Prasad R. (eds) *Microbial Action on Hydrocarbons*. Springer, Singapore
3. Atlas, R. M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1-3), 317-327.
4. Faten, A. M., & Abeer, A. A. E. A. (2013). Enzyme activities of the marine-derived fungus *Alternaria alternata* cultivated on selected agricultural wastes. *Journal of Applied Biological Sciences*, 7(1), 39-46.
5. Head, I. M., & Swannell, R. P. (1999). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current opinion in biotechnology*, 10(3), 234-239.
6. Zhang, Ji, and James J. Elser. "Carbon: nitrogen: phosphorus stoichiometry in fungi: a meta-analysis." *Frontiers in microbiology* 8 (2017): 1281.
7. Gutiérrez, M. H., Vera, J., Strain, B., Quiñones, R. A., Wörmer, L., Hinrichs, K. U., & Pantoja-Gutiérrez, S. (2020). Biochemical fingerprints of marine fungi: implications for trophic and biogeochemical studies. *Aquatic Microbial Ecology*, 84, 75-90.
8. McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A. and Sanni, G.O., 2012. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(1), p.10.
9. TIP 2 Fate of Marine Oil Spills. <https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/document/tip-02-fate-of-marine-oil-spills/> (accessed on 2020)
10. Galic, M., Cilerdzic, J., Vukojevic, J., Stajic, M., & Brceski, I. (2018). Potential of selected micromycetes for wheat straw degradation. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 19(3), 1116-1122.
11. Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., & Al-Sabri, A. E. (2016). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 23(2), 211-218.

12. Al-Hawash, A. B., Zhang, X., & Ma, F. (2019). Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *MicrobiologyOpen*, 8(1), e00619.
13. Chulalaksananukul, S., Gadd, G. M., Sangvanich, P., Sihanonth, P., Piapukiew, J., & Vangnai, A. S. (2006). Biodegradation of benzo (a) pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *FEMS microbiology letters*, 262(1), 99-106.
14. Al-Hawash, A. B., Alkooranee, J. T., Abbood, H. A., Zhang, J., Sun, J., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnology reports*, 17, 104-109.
15. Effendi, A. J., Karden, E., & Helmy, Q. (2018). Biosurfactant-Enhanced Petroleum Oil Bioremediation. In *Microbial Action on Hydrocarbons* (pp. 143-179). Springer, Singapore.
16. Colwell, R. R., Walker, J. D., & Cooney, J. J. (1977). Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *CRC critical reviews in microbiology*, 5(4), 423-445.
17. Paulauskienė, T., & Jucikė, I. (2015). Aquatic oil spill cleanup using natural sorbents. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14874-14881.
18. Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241.
19. Nathan VK, Kanthimathinathan SR, Rani ME, Rathinasamy G, Kannan ND (2018). Biobleaching of waste paper using lignolytic enzyme from *Fusarium equiseti* VKF2: amangrove isolate. *Cellulose* 25(7):4179–4192.

Išradimo apibrėžtis

1. Naftos angliavandenilių skaidymo vandenyje būdas naudojant grybus besiskiriantis tuo, kad skaidytini naftos angliavandeniliai kontaktuoja su paruoštu grybų inokuliatu, kuris sudarytas bent iš šių komponentų:

- grybų, išskirtų iš Baltijos jūros pakrantės smėlio ir vandens mėginių, kamienų;
- ekologiškos pagalbinės medžiagos, veikiančios kaip natūralus sorbentas.

2. Būdas, pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad grybų kamienai yra parinkti iš *Fusarium equiseti*, *Clonostachys rosea*, *Alternaria rosea* ir *Emericellopsis sp.*

3. Būdas, pagal 1 ir 2 punktus, besiskiriantis tuo, kad pasirinkta aplinkai nekenksminga pagalbina medžiaga, ant kurios imobilizuotas bent vienas grybų kamienas, yra parinkta iš: kviečių šiaudų, avižių šiaudų, ryžių šiaudų, kukurūzų šiaudų, miežių arba javų šiaudų, arba kviečių sėlenų, ar pjuvenų.

4. Būdas, pagal 1 - 3 punktus, besiskiriantis tuo, kad pasirinkta aplinkai nekenksminga pagalbina medžiaga veikia kaip natūralus naftos sorbentas.

5. Būdas, pagal 1 - 4 punktus, besiskiriantis tuo, kad prieš liofilizavimą papildomos maistinės medžiagos, pavyzdžiui, azotas ir fosforas, yra imobilizuojamos ant aplinkai draugiškos pagalbinės medžiagos, atsižvelgiant į aplinką, kurioje medžiaga bus naudojama.

6. Būdas, pagal 1 - 5 punktus, besiskiriantis tuo, kad fermentų kompozicijas, gaunamas iš grybų kamienų, galima naudoti kartu su grybų kamienais, kur fermentų kompozicijos yra imobilizuotos ant aplinkai draugiškų pagalbinių medžiagų.

7. Būdas, pagal 1 - 6 punktus, besiskiriantis tuo, kad inokuliatas, kontaktuojantis su naftos angliavandeniliais keletą kartų, gali būti skirtingos sudėties pagal naudojamas grybų kultūras ir/arba pagal skirtingą aplinkai draugišką pagalbina medžiagą ir/arba pagal maistines medžiagas su papildomu azotu ir fosforu.

8. Būdas, pagal 1 - 7 punktus, besiskiriantis tuo, kad kietųjų dalelių pavidalo inokuliatas paskirstomas ant naftos angliavandenilių, išsklaidant jį iš laivo ar orlaivio tiesiogiai ant užteršto vandens paviršiaus.

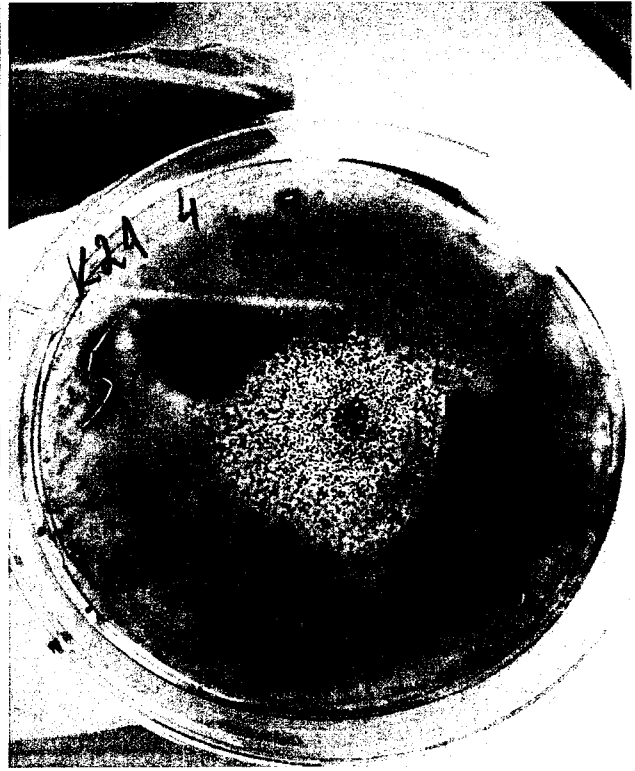
9. Būdas, pagal 1 - 8 punktus, besiskiriantis tuo, kad grybų kamienų kultūros yra laikomos konservuotos iki panaudojimo laiko.

10. Būdas, pagal 1 - 9 punktus, besiskiriantis tuo, kad grybų inokuliatas paskirstomas ant naftos angliavandenilių, kai vandens temperatūra aukštesnė nei +15 °C.

11. Būdas, pagal 1 - 10 punktus, besiskiriantis tuo, kad galima papildomai taikyti metodą, grįstą naftos angliavandenilių aerobiniu skaidymu.

12. Būdas, pagal 1 - 11 punktus, besiskiriantis tuo, kad galima papildomai naudoti grybo *Emericellopsis sp.* padermę natūraliai mikroflorai atkurti.

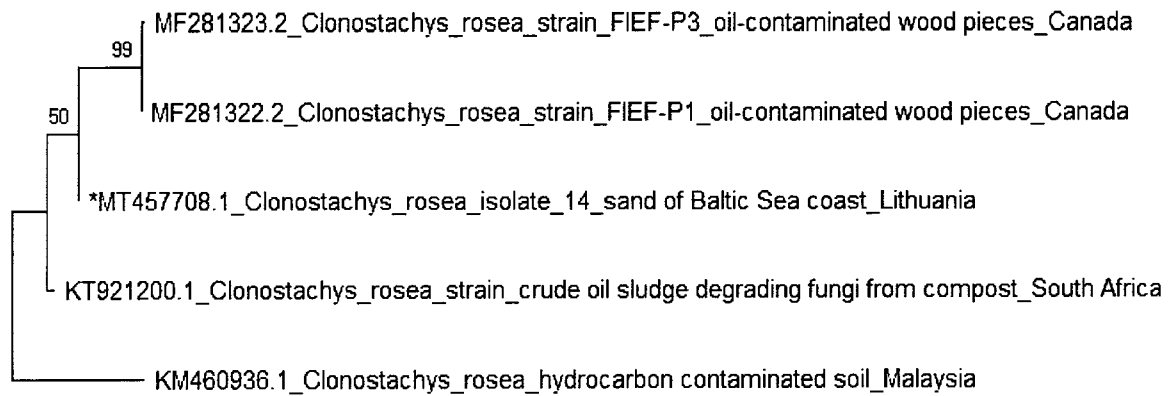
20.08.13



1 pav.

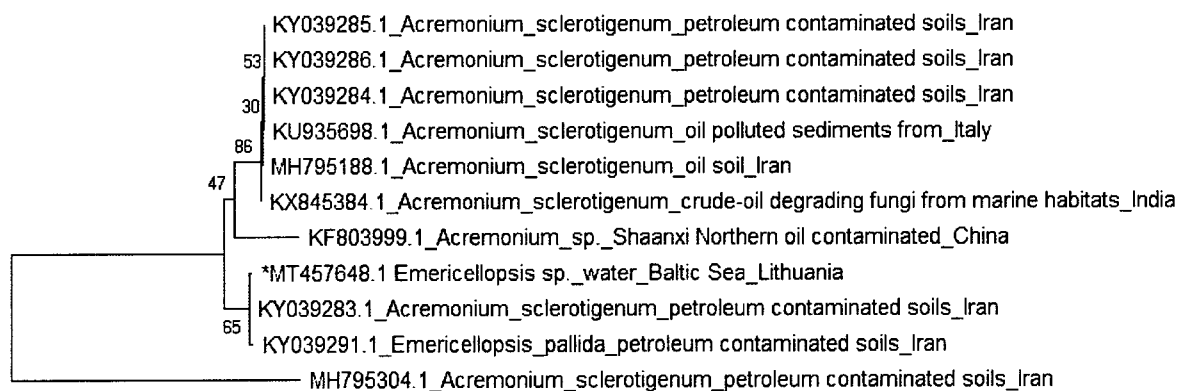


2 pav.



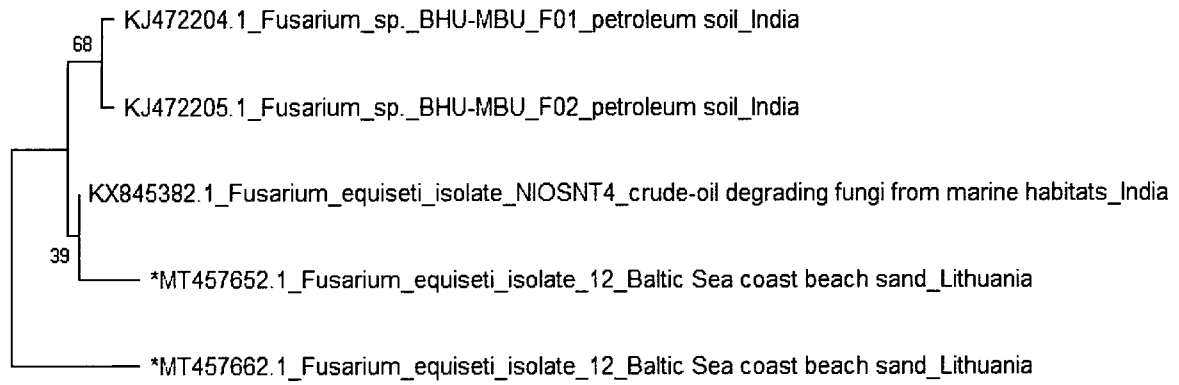
0.0050

3 pav.



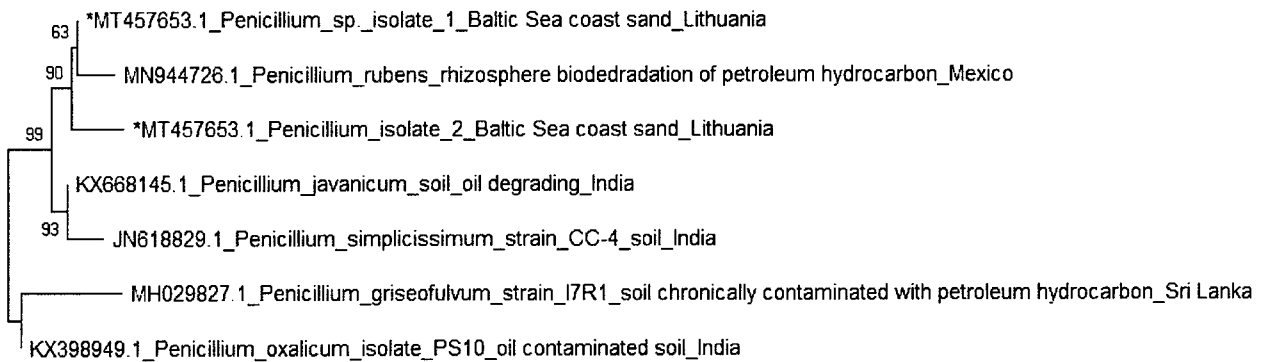
0.10

4 pav.



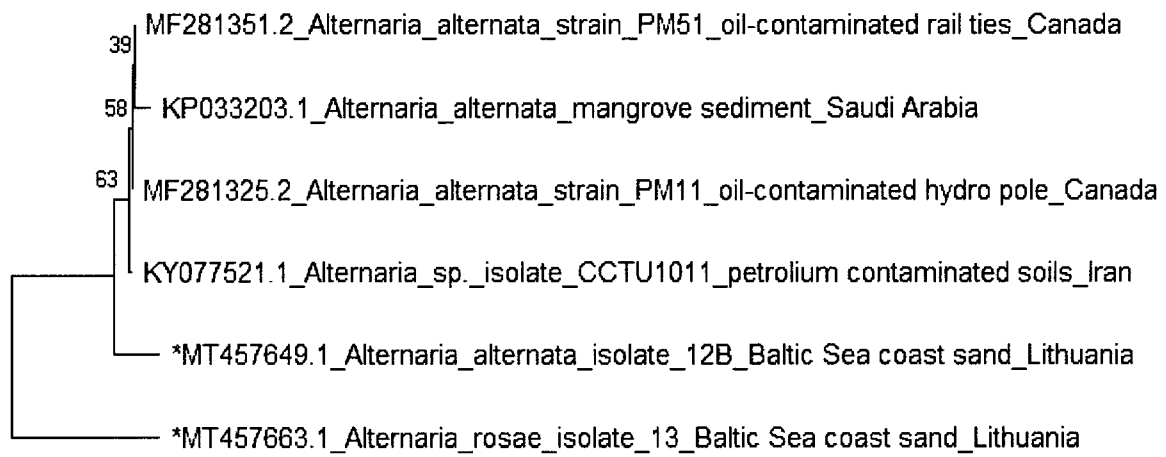
0.0010

5 pav.



0.020

6 pav.



0.010

7 pav.