

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2024 507**
(22) Paraiškos padavimo data: **2024-02-07**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2024-08-12**
(45) Patento paskelbimo data: **2024-09-10**

(73) Patento savininkas:
Gamtos tyrimų centras, Akademijos g. 2, 08412 Vilnius, LT
UAB „GVT LT“, Antakalnio g. 42-41, 10304 Vilnius, LT
(72) Išradėjas:
Algimantas PAŠKEVIČIUS, LT
Jonas ŽVIRGŽDAS, LT
Jurgita ŠVEDIENĖ, LT
Spartakas PETROVAS, LT
Ieva PAUNKSNYTĖ-MARKEVIČIENĖ, LT
Irma GALGINIENĖ, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Virgina Adolfina DRAUGELIENĖ, 8, UAB TARPINĖ, A.P.Kavoliuko g. 24-152, LT-04328 Vilnius, LT

LT 7087 B

(54) Pavadinimas:
Biopreparatas naftos produktais užterštam gruntui valyti ir valymo būdas

(57) Referatas:
Išradimas priklauso biotechnologijos ir aplinkos apsaugos sritims ir skirtas naftos produktais užterštam gruntui valyti. Biopreparatas apima naftą oksiduojančių mikroorganizmų kompleksą kartu su mikroorganizmus maitinančių maistinių medžiagų mišiniu, kuriame minėtas mikroorganizmų mišinys apima bakterijų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus, mielių mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus ir mikroskopinių grybų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus.

TECHNIKOS SRITIS

Išradimas priklauso biotechnologijos ir aplinkos apsaugos sritims ir skirtas naftos produktais užterštam gruntui valyti. Sukurtas kompleksinis biopreparatas, kurį sudaro įvairių sistematinių grupių mikroorganizmai (bakterijos, mielės ir kiti mikroskopiniai grybai).

TECHNIKOS LYGIS

LT patento Nr. 4793 B aprašyme aprašyta mielių *Candida lipolytica* C. 6.1-5 padermė, oksiduojanti naftą ir jos produktus. Ši padermė naudojama grunto ir vandens, užteršto naftos produktais, valymui. Šios padermės trūkumas yra tas, kad valymo efektyvumas yra nepakankamas.

LT patento Nr. 4794 B aprašyme aprašyta mikroskopinių grybų *Trichoderma harzianum* VNB-16 padermė, skaidanti mazutą, jos gavimo būdas ir panaudojimas. Ši padermė gali būti panaudota užteršto naftos produktais dirvožemio (grunto) valymui. Šios padermės trūkumas – nepakankama naftos produktų biodegradacija dirvožemyje.

LT patento Nr. 4792 B aprašyme aprašyta bakterijų *Pseudomonas fluorescens* IGN 57 padermė, skaidanti naftą ir naftos produktus. Šios padermės trūkumas – per daug lėtas naftos degradacijos procesas.

LT patento Nr. 5057 B aprašyme atskleidžiamas biopreparatas nafta ir jos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti, jo gavimo būdas ir panaudojimas. Naftos angliavandenilius oksiduojančių mikroorganizmų mišinį sudaro tarpusavyje susijusių hidrofilinių ir lipofilinių mikroorganizmų asociacija. Šio biopreparato trūkumas yra jo ribotas panaudojimas, o jo sudėtyje esantys mikroorganizmai silpnai ardo sunkiųjų frakcijų naftos produktus (mazutą). Efektyviai veikia tik esant nedidelėms naftos angliavandenilių koncentracijoms.

LT patento Nr. 6162 B aprašyme atskleidžiamas kompleksinis aplinkos valymo nuo naftos teršalų būdas, kuriame naudojami *Acinetobacter*, *Pseudomonas* padermės, o pats valymo procesas užbaigiamas fitoremediacijos būdu. Šis būdas nors ir efektyvus, tačiau pagrindinis trūkumas – ilgas paruošiamasis laikotarpis, kuris apima naftos produktų ir aplinkos parametrų vertinimą, valymo būdo, mikroorganizmų

derinių ir tinkamiausių augalų rūšių parinkimą.

LT Patento Nr. 6625 B aprašyme atskleidžiamas bakterinis preparatas, skirtas naftos produktų oksidacijai, kuris susijęs su biologiniu angliavandenilių skaidymu dirvožemyje panaudojant nepatogeninę bakteriją *Acinetobacter calcoaceticus* BT8, kuri geba skaidyti naftos angliavandenilius bei fiksuoti ore esantį azotą. Šio metodo trūkumas yra tas, kad reikalingas pastovus preparato purškimas ant dirvožemio 2 kartus per savaitę.

LT Patento Nr. 5579 B aprašyme atskleidžiamas grunto, užteršto nafta arba jos produktais, biologinio valymo būdas *ex situ* arba *in situ* sąlygomis, tačiau šis būdas reikalauja ilgo pasiruošimo, nes pradinėje valymo stadijoje reikia įterpti induočių augalų – žieminių rugių (*Secale cereale*) žaliosios biomasės kaip fiziologiškai aktyvių junginių šaltinį.

US 6652752 patento aprašyme atskleidžiamas nafta ir jos produktais užteršto dumblo, apimančio naftos angliavandenilių mišinį, biologinio skaidymo būdas. Būdas apima vandeninio tirpalo formavimą reaktoriuje iš nafta ir jos produktais užteršto dumblo, naftos-vandens emulsijos, bakterijų kultūros ir maistinių medžiagų, skirtų bakterijų kultūrai. Bakterijų kultūra auga ant naftos angliavandenilių, kaip vienintelio anglies šaltinio, yra išskirta iš angliavandeniliais užteršto dirvožemio ar angliavandenilių turinčio dumblo ar kitos aplinkos, kurioje gausu angliavandenilius skaidančių bakterijų. Vandeninį tirpalo palaikymą aerobinėmis sąlygomis reaktoriuje ne žemesnėje kaip 10 °C temperatūroje tiek laiko, kiek pakaktų sumažinti angliavandenilio kiekį ne mažiau kaip 25 % ir vandeninio tirpalo, turinčio sumažintą angliavandenilių kiekį, išleidimą iš reaktoriaus. Būdas gali būti naudojamas biologiškai skaidyti dumblą, kuriame yra aromatinių medžiagų, dervų ir asfaltelių.

Šis būdas yra sudėtingas ir ilgas procesas. Naudojami neidentifikuoti mikroorganizmai, todėl biotechnologinis procesas gali būti sunkiai kontroliuojamas, o be to ir naftos angliavandenilių biodegradacijos lygis gali būti skirtingas.

US 6649400 B2 patente aprašytas biopreparatas, skirtas naftos produktais užterštam gruntui valyti, apimantis naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinį, kuriame yra bakterijų, turinčių gebėjimą oksiduoti naftos produktus ir mikroorganizmus maitinančių maistinių medžiagų mišinį. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinį sudaro *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*,

Flavobacterium ir *Moraxella* genčių bakterijų padermės, kurios buvo išskirtos iš jūros vandens. Mikroorganizmus galima naudoti atskirai arba mišiniuose.

Šiame patente taip pat aprašytas naftos produktais užteršto grunto valymo būdas, apimantis šias stadijas: (a) paruošiamas bakterijų mišinys, ir (b) laukiama kol bakterijos suardys naftos produktus, tai trunka maždaug nuo 7 dienų iki maždaug 56 dienų.

Šio biopreparato ir valymo būdo trūkumas yra sudėtingas preparato paruošimas, nes mikroorganizmai įterpiami ne tiesiogiai į substratą, o per substratą nešėją, kuriuo gali būti vermikulitas, ceolitas, celiuliozė, krakmolos.

SPRENDŽIAMA TECHNINĖ PROBLEMA

Išradimu siekiama supaprastinti biopreparato paruošimą, padidinant biopreparato, skirto naftos produktais užterštam gruntui valyti, efektyvumą ir užteršto naftos produktais grunto valymo greitį.

IŠRADIMO ESMĖS ATSKLEIDIMAS

Problemą išspręsti pagal šį išradimą yra pasiūlytas biopreparatas, skirtas naftos produktais užterštam gruntui valyti, naudojant naftą oksiduojančių mikroorganizmų kompleksą kartu su mikroorganizmus maitinančių maistinių medžiagų mitybine terpe, kur minėtas mikroorganizmų mišinys apima bakterijų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus, mielių mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus ir mikroskopinių grybų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus.

Naftą oksiduojančių mikroorganizmų kompleksą sudarantys mikroorganizmai yra išskirti iš naftos produktais užterštų dirvožemių ir laboratorinėmis sąlygomis atrinktos aktyviausios padermės, kurios priklauso bakterijų: *Klebsiella oxytoca* B-30 padermei, *Acinetobacter baumannii* B-31 padermei, *Rhodococcus fascians* B-32, *Pseudomonas koreensis* B-33 padermei, *Pseudomonas brassicacearum* B-34 padermei; mielių: *Yarrowia lipolytica* M-238 padermei, *Rhodotorula mucilaginosa* M-239 padermei, *Rhodotorula diobovata* M-240 padermei, *Sporobolomyces roseus* M-241 padermei; mikroskopinių grybų: *Trichoderma longibrachiatum* G-222 padermei,

Sarocladium kiliense G-223 padermei, *Penicillium dierckxii* G-224 padermei.

Pasiūlytas naftos produktais užteršto grunto valymo būdas biopreparatu, apimantis šiuos etapus:

a) užterštas gruntas supilamas į nuo 1,2 iki 1,7 m aukščio kaupus, kur pradinis naftos produktų (C₁₀ -C₄₀) kiekis užterštame grunte yra iki 50 g/kg užteršto grunto;

b) paruošiamas naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinys, kuris apima išskirtas iš naftos produktais užterštų dirvožemių ir atrinktas laboratorinėmis sąlygomis aktyviausias padermes, kurios priklauso bakterijų: *Klebsiella oxytoca* B-30 padermei, *Acinetobacter baumannii* B-31 padermei, *Rhodococcus fascians* B-32 padermei, *Pseudomonas koreensis* B-33 padermei, *Pseudomonas brassicacearum* B-34 padermei; mielių: *Yarrowia lipolytica* M-238 padermei, *Rhodotorula mucilaginosa* M-241 padermei, *Rhodotorula diobovata* M-240 padermei, *Sporobolomyces roseus* M-241 padermei; mikroskopinių grybų: *Trichoderma longibrachiatum* G-222 padermei, *Sarocladium kiliense* G-223 padermei, *Penicillium dierckxii* G-224 padermei;

c) Paruošiama mitybinė terpė, kurios sudėtis yra: amonio nitratas – 1,5 g; NPK (16-16-16) – 0,05 g; KCl – 0,25 g; cukrus – 0,85 g; dyzelinas – 3–6 ml; alaus misa – 15–20 ml; naftos produktais užterštas gruntas – 10 g; vanduo 1000 ml; mitybinės terpės pH 7;

d) vykdomas visų kartu naftą oksiduojančių mikroorganizmų b) etape paruošto mikroorganizmų mišinio sužadimas, panaudojant mitybinę terpę, paruoštą

c) etape, o sužadimas vyksta maždaug 48 val., esant maždaug 24 °C temperatūrai;

e) sužadintas d) etape naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinys gausinamas maždaug 72 val. fermenteryje, esant maždaug 24 °C temperatūrai naudojant skystą mitybinę terpę, kurios sudėtyje yra amonio nitratas – 1,5 g; NPK (16-16-16) – 0,05 g; kalio chloridas – 0,25 g; dyzelinas – 4,0 ml; vanduo 1000 ml, kur terpės pH 7;

f) e) etape gautas naftą oksiduojančių mikroorganizmų sužadintas ir

pagausintas mišinys skystos suspensijos pavidalu įterpiamas į valomą gruntą santykiu: 3 litrai suspensijos (10^8 KSV/ml) (KSV – kolonijas sudarantys vienetai) į 0,5 m³ valomo grunto;

g) gruntas reguliariai, maždaug kas 2 savaites purenamas, maždaug kas mėnesį nustatomas mikroorganizmų kolonijas sudarančių vienetų (KSV/g) skaičius, maždaug kas mėnesį nustatomas dirvožemio pH, drėgmė ir temperatūra, bandymo pradžioje ir po kiekvieno mėnesio valymo nustatomas

likutinis naftos produktų kiekis (g/kg) pagal LST EN ISO 16703 (LAND 89-2010).

IŠRADIMO NAUDINGUMAS

Pagal išradimą pasiūlytas biopreparatas sudarytas iš skirtingų sistematinių grupių mikroorganizmų: bakterijų, mikroskopinių grybų, mielių ir dėl to intensyviai ir greitai vyksta naftos bei jos produktų biodegradacija. Mikroorganizmų mišinys lengvai paruošiamas ir gali būti aktyvus esant iki 5 % naftos angliavandenilių užterštame grunte.

Pasiūlyto biopreparato mikroorganizmai yra išskirti iš nafta ir jos produktais užteršto grunto. Prieš įterpimą juos sužadina, o vėliau pagausina fermenteriuose, giluminiu būdu, panaudojant mitybines terpes. Šis biopreparatas yra pranašesnis už kitus gaminamus preparatus, kadangi sudarytas iš skirtingų sistematinių grupių mikroorganizmų ir lengviau adaptuojasi prie substrate jau esančių mikroorganizmų ir todėl sparčiau vykdo naftos bei jos produktų biodegradaciją.

Išradimas detaliau paaiškinamas brėžiniu, kur pavaizduotas mikroorganizmų gausumas juos auginant skystoje terpėje su 1 % dyzelino.

TINKAMIAUSI IŠRADIMO REALIZAVIMO PAVYZDŽIAI

Biopreparato gamybai reikalingų mikroorganizmų gavimas apima: mikroorganizmų paėmimą, išskyrimą iš nafta ir jos produktais užteršto grunto, identifikavimą, naftą oksiduojančių mikroorganizmų atranką; panaudojimą laboratorinėmis ir lauko sąlygomis.

ĖMINIŲ PAĖMIMAS, IŠSKYRIMAS IR IDENTIFIKAVIMAS

Ėminiai buvo imami iš naftos produktais užterštų dirvožemių (Klaipėdos, Radviliškio, Kauno, Vilniaus r.). Naftą oksiduojantiems mikroorganizmams išskirti buvo naudojamos terpės su dyzelinu, kaip vieninteliu anglies šaltiniu. Bakterijoms išskirti buvo naudojama tokios sudėties terpė: NH_4Cl – 2,0 g; NaCl – 5,0 g; Na_2HPO_4 – 3,0 g; KH_2PO_4 – 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 g; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 g;

$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,02 g; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 g; dyzelinas – 10,0 ml; distiliuotas vanduo – 1000 ml (pH – 6,7–7,0). Mielėms ir mikroskopiniams grybams išskirti buvo naudojama tokios sudėties: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,0 g; K_2HPO_4 – 0,15 g; KH_2PO_4 –

0,85 g; MgSO_4 – 0,5 g; NaCl – 0,1 g; CaCl_2 – 0,1 g; dyzelinas – 10,0 ml (pH – 6,7–7,0). Mikroorganizmai buvo auginami termostate: bakterijos – 2–3 paras 30 °C temperatūroje, o mielės ir mikroskopiniai grybai – 3–5 paras 22–28 °C temperatūroje. Išaugusios morfologiškai skirtingos mikroorganizmų kolonijos buvo gryninamos jas persėjant į Maitinamąjį agarą (*Nutrient agar*, Liofilchem, Italija) ir Saburo dekstrozės agarą (*Sabouraud Dextrose Agar*, Liofilchem, Italija). Išskirti mikroorganizmai buvo identifikuoti naudojant MALDI-TOF masių spektrometrą (Bruker, JAV).

MIKROORGANIZMŲ ATRANKA

Bandymams buvo naudojami mikroorganizmai, išskirti iš naftos angliavandeniliiais užteršto dirvožemio. Buvo atliekama mikroorganizmų atranka pagal jų gebėjimą augti skystose terpėse su 1 % dyzelino. Terpių sudėtis mielėms ir mikroskopiniams grybams: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 3,5 g; K_2HPO_4 – 0,5 g; KH_2PO_4 – 0,5 g; MgSO_4 – 0,5g;

NaCl – 0,5 g; distiliuotas vanduo – 1000 ml; dyzelino 3 ml; tween 80 – 0,1 ml; terpės pH 7,0; terpė bakterijoms: NH_4Cl – 2,0 g; NaCl – 5,0 g; Na_2HPO_4 – 3,0 g; KH_2PO_4 – 0,1 g; MgSO_4 – 2,0 g; CaCl_2 – 0,01 g; MnSO_4 – 0,02 g; FeSO_4 – 0,01 g;

dyzelinas – 10 ml; distiliuotas vanduo – 1000 ml; terpės pH 7,0. Pradinis mikroorganizmų kiekis inokuliavimo į terpę metu buvo 10^5 KSV/ml. Mėgintuvėliai su

inokuliuota terpe buvo inkubuojami 26–28 °C termopurtyklėje, juos purtant 150 rpm greičiu, 72 val. Mikroorganizmų gausumo apskaita buvo vykdoma serijinių praskiedimų metodu išsėjant į aukščiau paminėtų mitybinių terpių lėkšteles (pridedant agaro). Lėkštelės inkubuotos 26–28 °C temperatūros termostate 2–4 dienas. Atrankos rezultatai pateikti pav.

Buvo atrinktos aktyviausiai augusios mikroorganizmų padermės, kurios vėliau buvo naudojamos naftos produktais užteršto grunto biologinio valymo modeliniam bandymui laboratorinėmis ir gamybinėmis – lauko sąlygomis.

BIOPREPARATO SUDĖTIS:

Bakterijos

Klebsiella oxytoca B-30 padermė buvo išskirta iš Radviliškio mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Gramneigiama, cilindrinė lazdelės formos, nejudri, turinti kapsulę bakterija. Dydis 2 x 5 µm. Gerai auga ant triptono sojos agaro ir kitų

bakterijoms auginti naudojamų mitybinių terpių. Kolonijos gleivinės struktūros, iškili, blizgios, balkšvos – kreminės spalvos.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Fakultatyvinis anaerobas. Optimali augimo temperatūra 35–37 °C, išauga per 24 val., pH 6–8. Fermentuoja laktozę, indolo reakcija – teigiama.

Acinetobacter baumannii B-31 padermė buvo išskirta iš Radviliškio mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Trumpa, beveik apvali, lazdelės formos, pleomorfinė, nejudri, gramneigiama bakterija. Dydis 1,0–1,5 x 1,5–2,5 µm. Gerai auga ant triptono sojos agaro ir kitų bakterijoms auginti naudojamų mitybinių terpių. Kolonijos iškili, gleivinės struktūros, nepigmentuotos, 1–2 mm skersmens.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geba augti 25–45 °C, tačiau optimali temperatūra – 30 °C, išauga per 18–24 val., pH 5–8. Oksidazės testas – neigiamas, trijų cukrų geležies agaro (TSI) terpėje – šarminė reakcija, katalazė – teigiama, citrato

utilizavimo testas – teigiamas, ureazės testas – neigiamas. Fermentacijos savybe nepasižymi.

Rhodococcus fascians B-32 padermė buvo išskirta iš Klaipėdos mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Aerobinė, pleomorfinė, nejudri, sporų neformuojanti, gramteigiama lazdelių arba kokių formos bakterija priskiriama *Actinomycetes* klasei. Gerai auga ant triptono sojos agaro ir kitų bakterijoms auginti naudojamų mitybinių terpių. Auga lėtai. Kolonijos oranžinės spalvos, lygios ir / arba šiurkščios struktūros. Ląstelių dydis $2,7 \times 0,69 \mu\text{m}$ ($1,5\text{--}4,0 \times 0,5\text{--}0,9 \mu\text{m}$).

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Optimali augimo temperatūra $25\text{--}28\text{ }^{\circ}\text{C}$, maksimali augimo temperatūra $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, minimali $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Didesnės nei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros stabdo bakterijos augimą. pH ribos 5–8. Oksidazės testas – neigiamas, o katalazės – teigiamas.

Pseudomonas koreensis B-33 padermė buvo išskirta iš Vilniaus mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Gramneigiama, sporų nesudaranti, judri lazdelės formos bakterija. Dydis $0,5\text{--}0,8 \times 1,5\text{--}3,0 \mu\text{m}$. Gerai auga ant triptono sojos agaro ir kitų

bakterijoms auginti naudojamų mitybinių terpių. Kolonijos baltos arba kreminės, iškilišios, gleivinės struktūros, įvairaus dydžio.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geriausiai auga esant $26\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai, tačiau kaip ir kiti *Pseudomonas* genties atstovai, geba augti $0\text{--}42\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros ribose. Indolo ir ureazės testai – neigiami. Pasižymi arginino, eskulino ir želatinos hidrolize, geba asimiliuoti D-manitolį, D-manozę, dekanatą bei gliukonatą, nefermentuoja gliukozės.

Pseudomonas brassicacearum B-34 padermė buvo išskirta iš Klaipėdos mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Gramneigiama, nesporuliuojanti lazdelės formos bakterija. Dydis – apie $0,4 \mu\text{m}$ pločio ir $0,8\text{--}1,5 \mu\text{m}$ ilgio. Gerai auga ant triptono sojos agaro ir kitų bakterijoms auginti naudojamų mitybinių terpių. Kolonijos baltos arba kreminės, iškilišios, gleivinės struktūros, įvairaus dydžio.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geriausiai auga esant 26–30 °C temperatūrai, tačiau kaip ir kiti *Pseudomonas* genties atstovai, geba augti 0–42 °C temperatūros ribose. pH ribos 5–8. Pasižymi gliukozės, D-manitolio, D-manozės, dekanoato ir gliukonato asimiliacija, arginino ir želatinos hidrolize, nefermentuoja gliukozės.

Mielės

Yarrowia lipolytica M-238 padermė buvo išskirta iš Radviliškio mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. *Ascomycota* skyriui priskiriama mielė. Tai dimorfinė mielių rūšis, turinti mielinę, pseudohifų ir septuotų hifų formas. Tikrasis micelis sudarytas iš 3–5 µm ir kelių milimetrų ilgio septuotų hifų. Gerai auga ant Saburo 2 % dekstrozės agarų. Kolonijos baltos, raukšlėtos, netaisyklingos formos.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geba asimiliuoti tokius anglies šaltinius kaip gliukozę, etanolis, glicerolis, eritritolis, D-manitolis, D-gliucitolis, pieno, gintaro, citrinų rūgštys, heksadekanas. Nepasižymi fermentacijos savybe. Skystina želatiną. Geba augti 2–32 °C temperatūroje, tačiau optimali augimo temperatūra – 24–26 °C.

Rhodotorula mucilaginosa M-239 padermė buvo išskirta iš Klaipėdos mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. *Basidiomycota* skyriui priskiriama mielė. Ląstelės pusrutulio, elipsoidinės arba kiaušinio formos, 1,5–4 x 4–12 µm dydžio. Gerai auga ant Saburo 2 % dekstrozės agarų. Kolonijos rausvos, varijuoja nuo šafrano oranžinės iki tamsios koralo raudonumo spalvos, blizgios, gleivių struktūros, lygios, bet kartais grubiu paviršiumi, kolonijos kraštas lygus.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geba asimiliuoti įvairius anglies šaltinius (gliukozę, sacharozę, rafinozę, galaktozę, trehalozę, maltozę, melezitozę ir kt.), tačiau jų nefermentuoja. Gali augti 0,5–35 °C temperatūroje, tačiau optimali augimo temperatūra yra 26–28 °C. pH ribos 3–10.

Rhodotorula diobovata M-240 padermė buvo išskirta iš Klaipėdos mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. *Basidiomycota* skyriui priklausanti mielė. Ląstelės

sferinės arba kiaušinio formos, 2–4 x 4–8 µm dydžio. Gera auga ant Saburo 2 % dekstrozės agaru. Kolonijos koralo raudonumo, gleivių struktūros, lygios, blizgios, kolonijos kraštas lygus.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geba asimiliuoti įvairius anglių šaltinius (gliukozę, inuliną, sacharozę, rafinozę, galaktozę, trehalozę, maltozę ir kt.), tačiau jų nefermentuoja. Gali augti 0,5–35 °C temperatūroje, tačiau optimali augimo temperatūra yra 26–28 °C. pH ribos 3–10.

Sporobolomyces roseus M-241 padermė buvo išskirta iš Radviliškio mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. *Basidiomycota* skyriui priskiriama mielė. Ląstelės apvalios arba pailgos ovalo formos, 3–6 x 7–10 µm dydžio. Gera auga ant Saburo 2 % dekstrozės agaru. Augimas lėtas. Kolonijų spalva raudona – oranžinė.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geba asimiliuoti įvairius anglių šaltinius (gliukozę, sacharozę, rafinozę, galaktozę ir kt.), tačiau jų nefermentuoja. Gali augti 0–25 °C temperatūroje. pH ribos 4–8.

Grybai

Trichoderma longibrachiatum G-222 padermė buvo išskirta iš Radviliškio mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Tai greitai augantis mikroskopinis grybas. Gera auga ant Saburo 2 % dekstrozės agaru. Pirmiausia išauga baltos spalvos purios kolonijos, kurios vėliau keičia spalvą į pilkšvai žalią. Sudaro vienaląstes lygiasienes konidijas.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geba augti plačiose temperatūros ribose, tačiau optimali augimo temperatūra yra ≥ 35 °C. Optimalus pH 4–5. Gali skaidyti celiuliozę, chitiną bei įvairius baltymus.

Sarocladium kiliense G-223 padermė buvo išskirta iš Klaipėdos mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Gera auga ant Saburo 2 % dekstrozės agaru. Kolonijos auga lėtai, iš pradžių dažnai būna kompaktiškos ir drėgnos, su amžiumi tampa miltelių pavidalo, panašios į zomšą. Gali būti baltos, pilkos, rožinės arba

oranžinės spalvos. Hifai yra smulkūs ir iš jų dažniausiai susidaro ylos formos stačios fialidės su nepastebimais kakleliais. Konidijos dažniausiai yra vienaląstės, retai pigmentuotos, rutuliškos arba cilindrinės ir dažniausiai susikaupusios kiekvienos fialidės viršūnėje. Gali būti chlamidosporų.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Geba augti 10–35 °C temperatūros ribose, tačiau optimali augimo temperatūra yra 20–25 °C. Efektyviai degraduoja polisacharidus, pektiną, krakmolą.

Penicillium dierckxii G-224 padermė buvo išskirta iš Vilniaus mieste esančios kuro bazės dirvožemio.

Morfologiniai požymiai. Gera auga ant Saburo 2 % dekstrozės agaro. Kolonijos pilkai žalios su baltu pakraščiu, prilietus birios. Turi hifus su pertvaromis (2–5 µm skersmens), iš kurių susidaro šakotas arba nešakotas konidioforas su antrinėmis šakomis, kurios suteikia į šepetį panašią išvaizdą.

Fiziologinės ir biocheminės savybės. Mezofilinis grybas. Auga 5–37 °C temperatūros ribose, optimali augimo temperatūra 20–30 °C, pH 3,0–4,5.

MIKROORGANIZMŲ PALAIKYMAS

Biopreparato mikroorganizmai yra saugomi Gamtos tyrimų centro (Akademijos g. 2, Vilnius, nuo 2023 sausio 5 d.) Biodestruktorių tyrimo laboratorijos mikroorganizmų kolekcijoje esant -70 °C temperatūrai.

BIOPREPARATO AKTYVUMO ĮVERTINIMAS UŽDAROJE SISTEMOJE LABORATORINĖMIS SĄLYGOMIS

Biopreparato mikroorganizmai (10^{12} KSV/ml) buvo įnešti į dyzelinu užterštą gruntą (20 g/kg grunto). Naftos produktų biodegradacija buvo vykdoma eksikatoriuose be priedų ir su priedais (NPK 16-16-16 – 0,576 g/kg; $\text{NH}_4(\text{NO}_3)$ – 0,416 g/kg ir KCl – 0,065 g/kg). Biodegradacija buvo vykdoma esant 24 °C temperatūrai, 28 paras. Kas savaitę buvo nustatomas mikroorganizmų kolonijas sudarančių vienetų skaičius (KSV/g) iš kiekvieno grunto varianto mėginio, išsėjant į mielėms ir mikroskopiniams grybams skirtą agarizuotą mitybinę terpę: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 3,5g; K_2HPO_4 – 0,5 g; KH_2PO_4 – 0,5 g; MgSO_4 – 0,5 g, NaCl – 0,5 gl; distiliuotas

vanduo – 1000 ml; dyzelinas – 3 ml/; tween 80 – 0,1 ml; pH 7,0. Terpė bakterijoms: NH_4Cl – 2,0 g; NaCl – 5,0 g; Na_2HPO_4 – 3,0 g; KH_2PO_4 – 0,1 g; MgSO_4 – 2,0 g; CaCl_2 – 0,01 g;

MnSO_4 – 0,02 g; FeSO_4 – 0,01 g; distiliuotas vanduo – 1000 ml, dyzelinas – 10 ml; pH 7,0. Kas 2 savaites buvo nustatomas naftos produktų kiekis (g/kg) sauso dirvožemio mėginiuose pagal LST EN ISO 16703 (LAND 89-2010).

Pažymėtina, kad dyzelinu užteršto grunto variante su biopreparato mikroorganizmais bei priedais visų tirtų mikroorganizmų kiekis buvo didesnis, nei bandymo variante be priedų (1 lentelė).

1 lentelė. Dyzeliną degraduojančių mikroorganizmų skaičiaus kitimas bandymo laikotarpiu.

Mikroorganizmai	Bandymo laikotarpis paromis	Kontrolė	Biopreparatas be priedų	Biopreparatas su priedais
Bakterijos	1	$1,2 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
	7	$2,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$
	14	$2,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$
	21	$6,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$
	28	$5,8 \times 10^3$	$1,3 \times 10^9$	$2,2 \times 10^{10}$
Mielės	1	$2,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
	7	$3,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$
	14	$6,3 \times 10^4$	$6,1 \times 10^5$	$6,1 \times 10^6$
	21	$4,2 \times 10^3$	$4,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
	28	$1,5 \times 10^1$	$4,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
Mikroskopiniai grybai	1	$1,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
	7	$2,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
	14	$3,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$

	21	$2,2 \times 10^2$	$9,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$
	28	$3,5 \times 10^2$	$9,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$

Dyzelinu užterštame dirvožemyje su biopreparatu be priedų dyzelino kiekio sumažėjimas buvo 61,76 %, o su priedais net 78,2 %. Kontroliniame variante savaiminis dyzelino kiekio sumažėjimas buvo 29,41 % (2 lentelė).

2 lentelė. Dyzelino kiekio kitimas bandymo variantuose.

Bandymo variantas	Dyzelino kiekis (g/kg)	
	Pradinis	Po 28 parų (be priedų)
Kontrolė	17,0	12,0
Biopreparatas	17,0	6,5
Biopreparatas + priedai	17,0	3,7

2 pavyzdys. Biopreparato panaudojimas užterštam gruntui valyti gamybinėmis sąlygomis.

Biopreparato mikroorganizmai visi kartu buvo sužadinami mitybinėje terpėje tokios sudėties: amonio nitratas – 1,5 g; NPK (16-16-16) – 0,5 g; KCl – 0,25 g; cukrus – 0,85 g; dyzelinas – 3–6 ml; alaus misa – 15–20 ml; naftos produktais užterštas gruntas – 10 g; vanduo (krano) – 1000 ml., terpės pH 7. Sužadinimas vyko 48 val. esant 24 °C temperatūrai. Po sužadinimo biopreparato mikroorganizmai visi kartu 72 val. gausinti 3 m³ tūrio fermentatoriuje esant 24 °C temperatūrai. Buvo naudota bendra tokios sudėties skysta mitybinė terpė: amonio nitratas – 1,5 g; NPK (16-16-16) – 0,5 g; kalio chloridas – 0,25 g; dyzelinas – 4,0 ml, vanduo 1000 ml, terpės pH 7. Prieš biopreparato įnešimą, o vėliau kas mėnesį, gruntas buvo tręšiamas trąšomis (g/kg): amonio nitratas – 0,36; NPK (16-16-16) – 0,216; kalio chloridas – 0,084. Valymas atliekamas tokiu būdu: užterštas gruntas supilamas į 1,7 aukščio kaupus. Pradinis naftos produktų kiekis valomame grunte buvo 50 g/kg. Biopreparato mikroorganizmai į valomą gruntą įterpiami skystos suspensijos pavidalu – 3 litrai suspensijos (10⁸ KSV/ml) (KSV – kolonijas sudarantys vienetai) 0,5 m³ grunto.

Gruntas reguliariai (kas 2 savaites) purenamas. Kas mėnesį nustatomas mikroorganizmų kolonijas sudarančių vienetų (KSV/g) skaičius, sėjant į bakterijoms, grybams ir mielėms skirtas agarizuotas mitybines terpes su 1 % dyzelino. Kas mėnesį buvo nustatomas dirvožemio pH, drėgmė ir temperatūra. Bandymo pradžioje ir po kiekvieno mėnesio valymo nustatomas likutinis naftos produktų kiekis (g/kg) pagal LST EN ISO 16703 (LAND 89-2010).

APLINKOS SĄLYGŲ KAITA VYKSTANT NAFTOS ANGLIAVANDENILIŲ BIOLOGINIAM SKAIDYMU

Nustatyta, kad pH išliko artimas neutraliam, pH 6,0–7,0 išsilaikė viso valymo metu. Vidutinė mėnesio aplinkos temperatūra tiriamuoju laikotarpiu svyravo nuo 10,5 iki 22,5 °C. Vidutinė aplinkos temperatūra per visą bandymo laikotarpį buvo 16,5 °C. Dirvožemio temperatūra tiriamuoju laikotarpiu svyravo nuo 15,0 °C iki 34,0 °C. Vidutinė dirvožemio temperatūra per visą tyrimo laikotarpį buvo 26,3 °C. Dirvožemio drėgmė tiriamuoju laikotarpiu tiek bandomuosiuose, tiek ir kontroliniuose kaupuose svyravo nuo 12,0 % iki 27,0 %. Vertinant dirvožemio drėgmės svyravimus tyrimo metu galima teigti, kad dirvožemio drėgnumas buvo artimas optimaliam, tačiau reikėtų pasirūpinti, kad būtų užtikrintas jos stabilumas. Priklausomai nuo dirvožemio drėgmės, jis buvo papildomai laistomas kas dvi savaites.

MIKROORGANIZMŲ SKAIČIAUS POKYČIAI TIRIAMAJAME DIRVOŽEMYJE

Naftą degraduojančių bakterijų skaičius dirvožemyje taikant biopreparatą didėjo iki 2-osios tyrimo savaitės, o vėliau svyravo nuo 10^{11} KSV/g iki 10^5 KSV/g.

Naftos angliavandenilius degraduojančių mielių skaičius išliko stabilus iki 5 tyrimo mėnesio ir mažai skyrėsi nuo pradinio mielių kiekio – svyravo nuo 10^5 iki 10^3 KSV/g.

Naftos angliavandenilius degraduojančių mikroskopinių grybų skaičius iki 5 tyrimo mėnesio su nedideliais svyravimais išliko 10^4 – 10^5 KSV/g ribose.

NAFTOS ANGLIAVANDENILIŲ KIEKIO POKYČIAI VALOMAME GRUNTE

Naftos angliavandenilių kiekis bandomajame variante visą tyrimo laikotarpį tolygiai mažėjo. Naftos angliavandenilių kiekis grunte su biopreparatu, lyginant su kontroliniu variantu, sumažėjo 64,00 % (3 lentelė).

3 lentelė. Naftos produktų kiekio kitimas valomame grunte su biopreparatu.

Bandymo laikotarpis (mėn.)	Naftos angliavandenilių kiekis (g/kg)		Naftos angliavandenilių kiekio pokytis bandymo variante (%)
	Kontrolė	Bandymo variantas	
0	50	50	0
1	49	39	22
2	48	33	34
3	47	22	56
4	47	20	60
5	46	18	64

Kompleksinis biopreparatas gali būti naudojamas stipriai užteršto grunto (iki 50 g/kg) apvalymui nuo naftos produktų.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Biopreparatas, skirtas naftos produktais užterštam gruntui valyti, naudojant naftą oksiduojančių mikroorganizmų kompleksą kartu su mikroorganizmus maitinančių maistinių medžiagų mitybine terpe, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas mikroorganizmų mišinys apima bakterijų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus, mielių mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus ir mikroskopinių grybų mikroorganizmus, gebančius oksiduoti naftos produktus.

2. Biopreparatas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naftą oksiduojančių mikroorganizmų kompleksą sudarantys mikroorganizmai yra išskirti iš naftos produktais užterštų dirvožemių ir laboratorinėmis sąlygomis atrinktos aktyviausios padermės, kurios priklauso bakterijų: *Klebsiella oxytoca* B-30 padermei, *Acinetobacter baumannii* B-31 padermei, *Rhodococcus fascians* B-32 padermei, *Pseudomonas koreensis* B-33 padermei, *Pseudomonas brassicacearum* B-34 padermei; mielių: *Yarrowia lipolytica* M-238 padermei, *Rhodotorula mucilaginosa* M-239 padermei, *Rhodotorula diobovata* M-240 padermei, *Sporobolomyces roseus* M-241 padermei; mikroskopinių grybų: *Trichoderma longibrachiatum* G-222 padermei, *Sarocladium kiliense* G-223 padermei, *Penicillium dierckxii* G-224 padermei.

3. Naftos produktais užteršto grunto valymo būdas biopreparatu pagal 1–2 punktus b e s i s k i r i a n t i s šiais etapais:

a) užterštas gruntas supilamas į nuo 1,2 iki 1,7 m aukščio kaupus, kur pradinis naftos produktų (C₁₀ –C₄₀) kiekis užterštame grunte yra iki 50 g/kg užteršto grunto;

b) paruošiamas naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinys, kuris apima išskirtus iš naftos produktais užterštų dirvožemių ir atrinktas laboratorinėmis sąlygomis aktyviausias padermes, kurios priklauso bakterijų: *Klebsiella oxytoca* B-30 padermei, *Acinetobacter baumannii* B-31 padermei, *Rhodococcus fascians* B-32 padermei, *Pseudomonas koreensis* B-33 padermei, *Pseudomonas brassicacearum* B-34 padermei; mielių: *Yarrowia lipolytica* M-238 padermei, *Rhodotorula mucilaginosa* M-241 padermei, *Rhodotorula diobovata* M-240 padermei,

Sporobolomyces roseus M-241 padermei; mikroskopinių grybų: *Trichoderma longibrachiatum* G-222 padermei, *Sarocladium kiliense* G-223 padermei, *Penicillium dierckxii* G-224 padermei;

c) paruošiama mitybinė terpė, kurios sudėtyje yra: amonio nitratas – 1,5 g; NPK (16-16-16) – 0,05 g; KCl – 0,25 g; cukrus – 0,85 g; dyzelinas – 3–6 ml; alaus misa – 15–20 ml; naftos produktais užterštas gruntas – 10 g; vanduo 1000 ml, mitybinės terpės pH 7;

d) vykdomas visų kartu, naftą oksiduojančių mikroorganizmų b) etape paruošto mikroorganizmų mišinio sužadinimas, panaudojant mitybinę terpę paruoštą c) etape, o sužadinimą vykdo maždaug 48 val., esant maždaug 24 °C temperatūrai;

e) sužadintas d) etape naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinys gausinamas maždaug 72 val. fermenteryje, esant maždaug 24 °C temperatūrai, naudojant skystą mitybinę terpę, kurios sudėtyje yra amonio nitratas – 1,5 g; NPK (16-16-16) – 0,05 g; kalio chloridas – 0,25 g; dyzelinas – 4,0 ml; vanduo 1000 ml, kur terpės pH 7;

f) e) etape gautas naftą oksiduojančių mikroorganizmų sužadintas ir pagausintas mišinys skystos suspensijos pavidalu įterpiamas į valomą gruntą santykiu: 3 litrai suspensijos (108 KSV/ml) (KSV – kolonijas sudarantys vienetai) 0,5 m³ valomo grunto;

g) gruntas reguliariai, maždaug kas 2 savaites purenamas, maždaug kas mėnesį nustatomas mikroorganizmų kolonijas sudarančių vienetų (KSV/g) skaičius, maždaug kas mėnesį nustatomas dirvožemio pH, drėgmė ir temperatūra, bandymo pradžioje ir po kiekvieno mėnesio valymo nustatomas likutinis naftos produktų kiekis (g/kg) pagal LST EN ISO 16703 (LAND 89- 2010).

