

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2024 533**
(22) Paraiškos padavimo data: **2024-09-30**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2025-08-25**
(45) Patento paskelbimo data: **2025-11-10**
(30) Prioritetas: **20241104893, 2024-05-27, IN**

(73) Patento savininkas:
UAB Baltic Hydrogen, Šilutės pl. 35G-36, LT-94105, Klaipėda, LT
(72) Išradėjas:
**Thomas Miles HASELTON, LT
Mayur PAL, LT
Banwari LAL, IN
Adomas BARANAUSKAS, LT**
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Jurga PETNIŪNAITĖ, 51, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

LT 7166 B

(54) Pavadinimas:
Vandenilio gamybos iš angliandeniliu turtingų rezervuarų būdas ir kompozicija
(57) Referatas:

Šis išradimas apima vandenilio gamybos iš rezervuaruose esančių angliavandenilių kompoziciją ir būdą. Kompozicija apima anaerobinės bazinės terpės (ABM) tirpalą su specifinėmis maistinėmis medžiagomis, vitaminais, mikroelementais, aktyviosiomis paviršiaus medžiagomis ir deguonies sugėrikliu, kur formulė sukurta mikrobų augimui ir vandenilio gamybai rezervuare optimizuoti. Vandenilio ekstrahavimo iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, būdas apima keletą pagrindinių etapų: parenkamas tinkamas angliavandenilių rezervuaras su zona, kurioje yra nafta, ir mobiliąją vandens fazę, paprastai pasiekiamą per gręžinius, besitęsiančius nuo paviršiaus iki zonos, kurioje yra nafta; per šiuos gręžinius į rezervuarą įleidžiama kompozicija, kurioje yra anaerobinė bazinė terpė (ABM) ir papildomos maistinės medžiagos, išlaikant specifinę skystčio temperatūrą nuo 60 °C iki mažiau nei 120 °C ir slėgį nuo 150 iki 300 barų.

IŠRADIMO TECHNIKOS SRITIS

Išradimas yra susijęs su energijos gamybos ir aplinkos tvarumo sritimi. Tiksliau – jis susijęs su nauja vandenilio gamybos kompozicija ir būdu vandenilio dujoms išgauti iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių.

IŠRADIMO TECHNIKOS LYGIS

Vandenilio dujos – tai svarbus kuras ir cheminių procesų substratas, reikšmingas ekonomine prasme. Vandenilis vis labiau pripažįstamas kaip švarus ir efektyvus energijos nešiklis, turintis didelį potencialą sumažinti šiltnamio efektą sukeliančių dujų išmetimą.

Telkiniai, kuriuose gausu angliavandenilių, pavyzdžiui, išeikvoti naftos ir dujų rezervuarai – tai didžiuliai organinių medžiagų šaltiniai. Šiuose telkiniuose anaerobinėmis sąlygomis klesti įvairios mikrobus kolonijos, gebančios metabolizuoti angliavandenilius ir išskirti vandenilio dujas kaip šalutinį produktą.

Vandeniliui gauti iš rezervuarų naudojamas mikrobus aktyvumo skatinimas telkiniuose, kuriuose gausu angliavandenilių. Šiame procese naudojami vietiniai mikroorganizmai, kurie anaerobinės fermentacijos būdu metabolizuoja rezervuare esančius angliavandenilių likučius. Į rezervuarą įpylus tirpalus, kuriuose yra svarbių maistinių medžiagų ir vitaminų, skatinamas mikrobus augimas ir vandenilio gamyba. Reguluojant įpylimo parametrus ir vykdant nuolatinę stebėseną, sukuriama optimalios mikrobus aktyvumo sąlygos išgauti skysčiams, kuriuose gausu vandenilio. Išgautos vandenilio dujos gali būti gryninamos ir naudojamos kaip švarus energijos šaltinis įvairiose srityse kaip atsinaujinantis ir aplinką tausojantis tradicinio iškastinio kuro pakaitalas.

Įprasti vandenilio gamybos būdai iš esmės pagrįsti iškastinio kuro perdirbimu – metano konversija garais arba anglies dujinimu, kuris susijęs su ženkliai išmetamos anglies kiekiu ir poveikiu aplinkai. Naudojant šiuos būdus, ne tik didinamas išmetamas šiltnamio efektą sukeliančių dujų kiekis – jiems įgyvendinti naudojami riboti ir neatsinaujinantys ištekliai, todėl kyla ilgalaikio tvarumo problema. Naudojant šiuos būdus be tikslinio mikrobus aktyvumo stimuliavimo ir augimo sąlygų optimizavimo, natūralus vietinių mikroorganizmų vandenilio gamybos potencialas

negali būti iki galo realizuotas.

Naudojant įprastus mikrobiologinius procesus, susiduriama su efektyvumo ir masto problemomis. Nėra esamų kompozicijų tikslios formulės, reikalingos mikrobų augimui ir vandenilio gamybai optimizuoti telkiniuose, kuriuose gausu angliavandenilių.

Be to, nėra standartizuoto mikrobų aktyvumo skatinimo ir veiklos parametrų kontrolės būdo, todėl mikrobiologinė vandenilio gamyba negali būti plačiai taikoma.

WO2005113784 aprašytas patobulintas mikrobiologinės vandenilio gamybos iš telkinių, kuriuose gausu angliavandenilių, būdas. Pagal aprašymą tai siūloma pasiekti, telkinyje stimuliuojant vietinių mikroorganizmų metabolizmą, kur būdas apima naudojimą egzogeninių (galimai – genetiškai modifikuotų) organizmų, kuriems būdingos tikslinės medžiagų apykaitos savybės. Šios medžiagų apykaitos savybės nėra apibrėžtos, išskyrus tai, kad jų poveikis yra pagerinti grynąją vandenilio gamybą, o pagal kontekstą numanoma, kad tai susiję su vandenilio suvartojimo slopinimu, o ne angliavandenilių metabolizavimu į vandenilį telkinyje. Tad šiame dokumente neįvertinamas ir neatskleidžiamas įvedimas į telkinį kitų mikroorganizmų dėl teigiamo mikrobiologinės gausos diversifikavimo telkinyje, kur minėti kiti mikroorganizmai nėra vietiniai ir kurie patys galėtų metabolizuoti angliavandenilius į molekulinį vandenilį bei padidinti vandenilio gamybą.

Liu, J.-F. et al. (The diversity of hydrogen-producing microorganisms in a high-temperature oil reservoir and its potential role in promoting the in situ process, Applied Environmental Biotechnology, Vol. 2, pp. 25-34, 2016) ištirta vandenilį išskiriančių mikroorganizmų reikšmė vandens gamybos naftos verslovėse reikšmė ir kultūros genų, kuriais užkoduota [FeFe] hidrogenazė, turinimas naudojant klonų biblioteką. Iš rezultatų matyti, kad [FeFe] hidrogenazės genai gautame vandenyje yra įvairūs ir priklauso *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes* ir nekultūriniais mikroorganizmams. Iš rezultatų galima spręsti, kad vandenilį gaminantys mikroorganizmai naftos rezervuaruose gali atlikti teigiamą vaidmenį, skatinant *in situ* biologinį procesą gaminant vandenilį, kai tik yra įprastų maistinių medžiagų.

Esamos metodikos, kaip įrodyta įprastais metodais ir ankstesniais bandymais, nėra pakankamai efektyvios ir masinės, kad būtų galima iki galo išnaudoti mikrobų aktyvumo potencialą šiuose rezervuaruose.

Atsižvelgiant į ankstesnius pavyzdžius ir trūkumus akivaizdu, kad reikia naujoviško sprendimo šioms problemoms išspręsti ir visam vandenilio gamybos iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, potencialui išnaudoti. Sukurta nauja vandenilio gamybos kompozicija ir vandenilio dujų išgavimo iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, būdas.

TRUMPAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šis išradimas yra susijęs su vandenilio gamybos iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, kompozicija ir būdu, panaudojant vietinį mikrobų aktyvumą bei tikslios anaerobinės bazinės terpės (ABM) tirpalo formulės sudarymą.

Kompozicija padidina mikrobų populiaciją ir fermentinį aktyvumą, kuris labai svarbus, skaidant angliavandenilius į vandenilio dujas. Vadovaujantis šiuo požiūriu, maksimaliai padidinama vandenilio gamyba nenaudojant papildomų mikroorganizmų ir siūlomas veiksmingesnis ir tvaresnis mikrobų išteklių naudojimo vandeniliui gauti iš rezervuarų būdas.

Šio išradimo įgyvendinimo pavyzdyje kompozicija sudaryta iš anaerobinės bazinės terpės (ABM) tirpalo su specifinėmis maistinėmis medžiagomis, vitaminais, mikroelementais, aktyviosiomis paviršiaus medžiagomis ir deguonies sugėrikliu, siekiant rezervuare optimizuoti mikrobų augimą ir vandenilio gamybą.

Kitame šio išradimo įgyvendinimo pavyzdyje vandenilio ekstrahavimo iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, būdas apima keletą pagrindinių etapų: parenkamas tinkamas angliavandenilių rezervuaras su zona, kurioje yra nafta, ir mobiliąja vandens faze, paprastai pasiekama per gręžinius, besitęsiančius nuo paviršiaus iki zonos, kurioje yra nafta; per šiuos gręžinius į rezervuarą įleidžiama kompozicija, kurioje yra anaerobinė bazinė terpė (ABM) ir papildomos maistinės medžiagos, išlaikant specifinę skysčio temperatūrą nuo 60 °C iki mažiau nei 120 °C ir slėgį nuo 150 iki 300 barų.

Kitame šio išradimo įgyvendinimo pavyzdyje po įleidimo etapo rezervuare generuojamas skystis, kuriame yra vandenilis ir vandenilio dujos išgaunamos iš pagaminto skysčio – švaraus bei tvaraus energijos šaltinio.

Kitame šio išradimo įgyvendinimo pavyzdyje skystis, įleidžiamas į

kompoziciją, gali apimti mikroorganizmus, kurių natūraliai nebūna angliavandenilių rezervuare; ir (arba) mikroorganizmų štamus, kurių natūraliai nėra angliavandenilių rezervuare, ir (arba) mikroorganizmų rūšis, kurių natūraliai nėra angliavandenilių rezervuare, ir (arba) d. genties mikroorganizmus, kurių natūraliai nėra angliavandenilių rezervuare.

Pažymėtina, kad nors šis išradimas buvo aprašytas, pateikiant nuorodas į tvirtinimo detales, jis neapsiriboja šiuo konkrečiu gaminamų objektų tipu ir gali būti pritaikytas ir kitų tipų objektų patikrai atlikti. Be to, nenukrypstant nuo išradimo apimties, galimos įvairios sistemos ir būdo modifikacijos ir pakeitimai.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Anksčiau pateikta santrauka ir toliau pateikiamas išsamus įvairių įgyvendinimo pavyzdžių aprašymas geriau suprantamas, skaitant jį kartu su šiame dokumente pateiktais brėžiniais. Iliustraciniais tikslais brėžiniuose atskleista tema, kuri neapsiriboja konkrečiais atskleistais būdais ir priemonėmis. Be to, šio aprašymo privalumai ir ypatybės bus geriau suprantamos, remiantis toliau pateiktu išsamiu aprašymu ir apibrėžtimi kartu su pridėtu brėžiniu, kuriame panašūs elementai identifikuojami panašiais simboliais ir kur:

1 pav. pateikta grafinė OD (600 nm) ir laiko valandomis ABM + sūrymo + naftos mėginyje priklausomybė;

2 pav. pateikta grafinė vandenilio gamybos ir laiko valandomis ABM + sūrymo (10%) + naftos (1%) mėginyje priklausomybė;

3 pav. pateikta grafinė OD (600 nm) ir laiko valandomis ABM + sūrymo + naftos mėginyje priklausomybė su deguonies sugėrikliu;

4 pav. pateikta grafinė vandenilio gamybos ir laiko valandomis ABM + sūrymo (10%) + naftos (1%) mėginyje priklausomybė su deguonies sugėrikliu;

5 pav. pateikta histograma, kurioje pavaizduota bakterijų, esančias naftos rezervuaruose, ištirtų ir išreikštų tipo lygmeniu, DNR, ir

6 pav. pateikta histograma, kurioje pavaizduota DNR bakterijų, esančių naftos rezervuaruose, ištirtų ir išreikštų klasės lygmeniu.

Anksčiau pateikta santrauka ir toliau pateiktas išsamus įvairių įgyvendinimo pavyzdžių aprašymas geriau suprantamas, skaitant jį kartu su šiame dokumente pateiktais brėžiniais. Iliustraciniais tikslais brėžiniuose pavaizduoti keli įgyvendinimo variantai, kurie gali būti tinkamesni. Reikėtų suprasti, kad pateikti įgyvendinimo pavyzdžiai neapsiriboja tiksliai pavaizduotomis detalėmis. Jei nenurodyta kitaip, brėžiniai neatitinka mastelio.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Toliau pateiktas pageidaujamas geriausias šio išradimo įgyvendinimo pavyzdys. Iš šio išradimo aprašymo taps aišku, kad išradimas neapsiriboja šiais iliustruotais įgyvendinimo pavyzdžiais – jis taip pat apima įvairias jo modifikacijas ir įgyvendinimo pavyzdžius, todėl šis aprašymas turi būti laikomas iliustraciniu, o ne ribojančiu. Nors aprašytas įgyvendinimo pavyzdys gali būti modifikuojamas ir keičiamas, naudojant alternatyvias konstrukcijas, reikia suprasti, kad nėra tikslo apriboti išradimo tik konkrečia aprašyta forma – priešingai, išradimas turi apimti visas modifikacijas, alternatyvias konstrukcijas, ir ekvivalentus, atitinkančius išradimo dvasią ir apimtį, kaip nurodyta apibrėžtyje.

Bet kuriame čia aprašytame įgyvendinimo pavyzdyje atviros sąvokos „sudarytas“, „apima“ ir pan. (kurios yra sąvokų „įskaitant“, „turi“ ir „b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad“) gali būti pakeistos atitinkamomis iš dalies uždaromis sąvokomis „iš esmės sudarytas iš“, „iš esmės apima“ ir pan. arba atitinkamų uždarų sąvokų „sudarytas iš“, „apima“ ir pan.

Čia vartojamos vienaskaitos formos reiškia ir vienaskaitą, ir daugiskaitą, nebent būtų aiškiai nurodyta, kad jos reiškia tik vienaskaitą.

Be to, čia vartojamos sąvokos „pirmas“, „antras“, „trečias“ ir pan. nereiškia jokios tvarkos, kiekio ar svarbos, o naudojamos vienam elementui atskirti nuo kito.

Sąvoka „rezervuaras kuriame gausu angliavandenilių“ reiškia požeminę geologinę formaciją, kurioje yra daug naftos ir (arba) gamtinių dujų.

Terminas „angliavandenilis“ reiškia junginį, kuriame yra tik vandenilio ir anglies atomas.

Sąvoka „mikroorganizmai“ apima bakterijas ir archėjas, jų fermentus ir kitus

produktus bei atitinkamus eukarijus. Suprantama, kad bakterijos ir archėjos paprastai reprezentuoja mikroorganizmus, kurie gali skaidyti naftą ir (arba) sunaudoti gautus produktus be deguonies.

Šis išradimas yra susijęs su vandenilio gamybos iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, kompozicija ir būdu, panaudojant vietinį mikrobus aktyvumą bei tikslios anaerobinės bazinės terpės (ABM) tirpalo formulės sudarymą.

Vandenilio gamybos iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, kompozicija sudaryta iš anaerobinės bazinės terpės (ABM) tirpalo, papildyto įvairiais komponentais, kuriuose yra 1,0–100,0 g/L NH_4Cl ; 0,33 g - 33,0 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1-10,0 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,33 - 33,0 g/L KCl ; 0,5–50,0 g/l KH_2PO_4 ; 4,0 - 400 g/l mielių ekstrakto; 0,4-40 g/L L-cisteino-HCl. H_2O ; 0,01 - 1 g/L bent vienos aktyviosios paviršiaus medžiagos; ir 1 ml vitaminų ir mikroelementų tirpalo.

Mikroelementų tirpalas sudarytas iš mikroelementų: nitrilotriacto rūgšties, MgSO_4 (magnio sulfato), MnSO_4 (mangano sulfato), NaCl (natrio chlorido), FeSO_4 (geležies sulfato), CoCl_2 (kobalto chlorido) ZnSO_4 (cinko sulfato), CuSO_4 (vario sulfato), $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (aliuminio kalio sulfato), H_3BO_3 (boro rūgšties) ir Na_2MoO_4 (natrio molibdatas).

Šie mikroelementai veikia kaip esminių medžiagų apykaitos reakcijų kofaktoriai ir katalizatoriai, kuriais užtikrinama vandenilį gaminančių mikroorganizmų nuolatinė veikla.

Be to, mikroelementų kiekis kompozicijoje, įskaitant jų koncentraciją, yra 1,5-150,0 mg/L nitrilotriacto rūgšties; 3,0 - 300,0 mg/L MgSO_4 ; 0,5 - 50,0 mg/L MnSO_4 ; 1,0 - 100,0 mg/L NaCl ; 0,1 - 10,0 mg/l FeSO_4 ; 0,1 - 10,0 mg/L CaCl_2 ; 0,1 - 10,0 mg/L CoCl_2 ; 0,1 - 10,0 mg/L ZnSO_4 ; 0,01 - 1 mg/L CuSO_4 ; 0,01 - 1 mg/L $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$; 0,01 - 1 g/L H_3BO_3 ir 0,01 - 1 g/L Na_2MoO_4 .

Vitaminų tirpalas kompozicijoje yra parinktas iš grupės, apimančios biotiną, folio rūgštį, piridoksino hidrochloridą, riboflaviną, tiaminą, nikotino rūgštį, pantoteno rūgštį, vitaminą B12, p- aminobenzenkarboksirūgštį ir tioktinę rūgštį. Šie vitaminai – tai esminiai kofaktoriai, reikalingi įvairiems fermentiniams procesams ir medžiagų apykaitos keliams.

Kompozicijoje taip pat gali būti angliavandenių šaltinis, įskaitant, bet tuo

neapsiribojant, cukraus formomis (pvz., gliukoze, sacharoze, fruktoze) ir (arba) krakmolais (pvz., kukurūzų krakmolu, bulvių krakmolu), lanksčiai, be kita ko, įtraukiant alternatyvius anglies šaltinius, tokius kaip pramoninis cukrus arba melasa.

Be to, aktyvioji paviršiaus medžiaga parinkta iš grupės, apimančios anijonines aktyviasias paviršiaus medžiagas, katijonines aktyviasias paviršiaus medžiagas, cviterionines aktyviasias paviršiaus medžiagas, nejonines aktyviasias paviršiaus medžiagas ir jų derinius. Šiame išradime naudojama paviršiaus aktyvioji medžiaga yra „Tween 80“.

Mielų ekstrakte yra įvairių elementų, įskaitant, bet neapsiribojant, aminorūgštis, azoto šaltiniais. Be to, kompozicijoje yra deguonies sugėriklis, palaikantis anaerobines sąlygas, parinktas iš grupės, be kita ko, apimančios L-cisteiną-HCl-H₂O, natrio sulfatą, eritorbatą, dietilhidroksilaminą (DEHA), hidrochinoną, hidraziną, karbohidrazidą ir metiletilketoksimą (MEKO). Šis junginys efektyviai pašalina deguonį iš aplinkos, užkertant kelią aerobiniam metabolizmui ir sudarant anaerobines sąlygas, reikalingas vandeniliui gaminti.

Kompozicijoje naudojamas deguonies sugėriklis yra L-cisteinas-HCl-H₂O.

Rezervuaras, kuriame gausu angliavandenilių, pageidautina, yra skysčio rezervuaras, kuriame gausu angliavandenilių, pvz., naftos/bitumo/sunkiosios naftos.

Vandenilio gavybos iš rezervuaro, kuriame gausu angliavandenilių, būdas apima tris etapus: angliavandenilių rezervuaro, apimančio naftos zoną, naudojimą su judriąja vandens faze, kur angliavandenilių rezervuaras apima bent vieną gręžinį, besitęsiantį nuo angliavandenilių rezervuaro paviršiaus iki naftingosios zonos viršutinės arba apatinės srities; kompozicijos, apimančios anaerobinę bazinę terpę (ABM) ir papildomas maistines medžiagas, įleidimą į bent vieną rezervuaro gręžinį, esant skysčio temperatūrai nuo 60 °C iki mažesnės nei 120 °C ir slėgiui nuo 150 iki 300 barų; vandenilį apimančio skysčio gamybą iš angliavandenilių rezervuaro po angliavandenilių rezervuaro gręžinių, kurie tęsiasi iki rezervuaro naftingosios zonos, turinčios viršutinės arba apatinės srities, atidarymo ir vandenilio dujų gavybą iš vandenilį apimančio skysčio.

Procese naudojamame skystyje dar gali būti bent vieno tipo mikroorganizmų, pasirinktinai – kelių rūšių mikroorganizmų, kurie yra tinkami angliavandeniliams paversti vandeniliu.

Be to, įleidžiamas skystis apima mažiausiai vieno tipo mikroorganizmus, parinktus iš grupės, be kita ko, apimančius termofilinius mikroorganizmus, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaete*, *Clostridia* ir *Syntrophus*.

Šie mikroorganizmai pasirodė esą ypač veiksmingi, paverčiant angliavandenilius vandeniliu. Įleidžiamas skystis yra 60–120 °C, pageidautina – 70–110 °C temperatūros.

Procese naudojamas skystis įleidžiamas 120–350 barų, pageidautina – 150–300 barų slėgio. Šis slėgio diapazonas yra optimalus, nes įleidimo slėgis neturi būti didesnis už ardą slėgį, o įleidimas žemesniu nei rezervuaro slėgiu neįmanomas.

Taikant šį būdą, rezervuare yra įdiegtas pH reguliatorius, kuris reguliuoja vandenilį gaminančių mikroorganizmų pH intervale nuo 6,0 iki 8,0.

pH reguliatorius pasirinktinai taip pat gali būti naudojamas kaip maistinė medžiaga – pavyzdžiui, fosfatas gali veikti ir kaip maistinė medžiaga, ir kaip buferinė medžiaga, užtikrinanti subalansuotą mikrobų ekosistemą, palankią ilgalaikiai vandenilio gamybai.

Viršutinė angliavandenilių rezervuaro naftos zonos sritis gali būti naftos zonos sritis, kuri tęsiasi per tam tikrą ilgį nuo aukščiausio naftos zonos taško gravitacijos jėgos kryptimi iki žemiausio naftos zonos taško, kur žemiausias naftos zonos taškas atitinka angliavandenilių rezervuaro pabaigą arba angliavandenilių rezervuaro vandens zonos pradžią.

Apatinė angliavandenilių rezervuaro naftos zonos sritis gali būti naftos zonos sritis, kuri tęsiasi per tam tikrą ilgį nuo žemiausio naftos zonos taško priešinga gravitacijai kryptimi iki aukščiausio naftos zonos taško, kur žemiausias naftos zonos taškas atitinka angliavandenilių rezervuaro pabaigą arba angliavandenilių rezervuaro vandens zonos pradžią.

Fermentų aktyvumas ir mikrobų populiacijos padidėjimas pasiekiamas reguliuojant temperatūrą, pH, maistinių medžiagų pasiekiamumą ir pridėdam tinkamų augimo stimuliatorių.

Be to, į rezervuarą įleisto ABM tirpalo koncentracija optimizuojama, atsižvelgiant į vietinių mikrobų populiacijos savybes ir pageidaujamą vandenilio gamybos greitį.

PAVYZDŽIAI

METODOLOGIJA

A. Anaerobinės bazinės terpės sudėties arba recepto paruošimas – šiame eksperimente buvo atliktas anaerobinės bazinės terpės (ABM) tobulinimas, siekiant maksimaliai padidinti bakterijų augimą ir vėlesnę vandenilio dujų išėigą, esant skirtingai temperatūrai.

Medžiagos ir būdai

Eksperimento metu ABM + naftos + sūrymo mišiniai buvo išpilstyti į 100 ml buteliukus, paliekant 30 ml darbinį tūrį. Buteliukai buvo prapūsti grynomis N₂ dujomis, kad būtų sukurta anaerobinė aplinka, ir užsandarinti guminėmis pertvaromis bei aliuminio užspaudžiamaisiais dangteliais. Be to, eksperimentai buvo atlikti, esant 60 °C ir 80 °C temperatūrai, kiekvienu atveju buvo pastebėtas panašus augimas.

a. Auginimo fazė:

- Sūrymo mėginiai (10 % tūrio) buvo įtraukti į ABM tirpalus, esant 60 °C arba 80 °C temperatūrai.
- ABM sudėtyje yra esminės maistinės medžiagos, tokios kaip azoto ir fosforo šaltiniai, mikroelementai ir vitaminai, skatinantys bakterijų augimą ir fermentinį aktyvumą.
- Bakterijų augimo kinetika buvo stebima 200 valandų, o didžiausia koncentracija buvo nustatyta, matuojant tirpalo drumstumą, esant 600 nm OD.
- Periodiškas mėginių ėmimas apėmė mėginių džiovinimą ir mikroskopinį tyrimą, kad būtų galima vizualizuoti bakterijų kolonijas.

b. Vandenilio gamybos fazė:

- Didžiausios bakterijų kultūros iš auginimo fazės buvo pasėtos į šviežią ABM, papildytą nafta (3,3% tūrio) specialiuose auginimo buteliuose.
- Tikslas buvo skatinti tolesnį bakterijų augimą ir kiekybiškai įvertinti

vandenilio dujų gamybą, naudojant dujų chromatografiją.

- Dujų analizei atlikti buvo paimti 2,0 ml dujų mėginiai iš kiekvieno butelio viršutinės dalies, po to buvo atlikta dujų chromatografinė analizė, naudojant „Agilent 7890B GC“ sistemą.

Stebėjimai ir išvados

1 pav. grafikas, sudarytas kaip grafinė ABM + sūrymo + naftos mėginio optinio tankio matavimų ir laiko (valandomis) priklausomybės išraiška, rodo, kad bakterijos pasiekia didžiausią augimo piką praėjus 72 valandoms, esant 0,20 optiniam tankiui. 1 pav. pavaizduotas optimizuotos ABM sudėties ABM + sūrymo + naftos mėginio naudojimas tvariam bakterijų augimui skatinti.

2 pav. pavaizduotas ABM kompozicijos veiksmingumas vandenilio dujų gamybai palengvinti per 240 valandų laikotarpį ABM + sūrymo (10 %) + naftos (1 %) mėginyje. 2 pav. grafikas, sudarytas kaip grafinė vandenilio gamybos ir laiko (valandomis) priklausomybės išraiška, rodo, kad per 48 valandas gaunama apie 7,5 bakterinio vandenilio.

ABM potencialas didinti anaerobinių bakterijų augimą ir vėlesnę vandenilio dujų gamybą yra puikus. Šiomis išvadomis pabrėžiama, kaip svarbu optimizuoti ABM sudėtį biotechnologinėms reikmėms ir pateikiamos įžvalgos apie tvarius mikrobų auginimo ir dujų gamybos būdus.

B. Anaerobinės bazinės terpės kompozicijos arba receptūros paruošimas su deguonies sugėrikliu

Šiuo eksperimentu apibrėžtas supaprastintas ABM receptas, papildytas deguonies sugėrikliu (L- cisteino-HCl-H₂O) anaerobinėms sąlygoms išlaikyti ir efektyviam bakterijų augimui bei vandenilio gamybai gerinti.

Medžiagos ir būdai:

a. Auginimo fazė: ABM kompozicija:

a NH₄Cl: 1 g/L

b KH_2PO_4 : 0,5 g/L

c mielių ekstraktas: 4,0 g/L

d L-cisteinas-HCl-H₂O (deguonies sugėriklis): 0,4 g/L

- Į ABM tirpalą pridėtas sūrymas (10% tūrio) ir nafta (2% tūrio).
- Bakterijų augimo kinetika buvo stebima, matuojant optinį tankį, esant 600 nm (OD600) per 72 valandų laikotarpį.
- Mėginių ėmimas apėmė periodinius matavimus, siekiant nustatyti maksimalų bakterijų augimą.

b. Vandenilio gamybos fazė:

- ABM sudėtis atitiko auginimo fazę.
- Sacharozės kiekis buvo papildomas, kad būtų galima stebėti vandenilio gamybos atsikūrimą po stabilizavimosi.
- Vandenilio dujų gamyba buvo stebima 288 valandas.
- Mėginiai buvo periodiškai analizuojami, siekiant nustatyti vandenilio dujų kiekį dujų chromatografijos būdu.

Stebėjimai ir išvados:

3 pav. pavaizduotas pastovus bakterijų augimo didėjimas, o didžiausias augimas pastebėtas po 72 valandų. Naudojant deguonies sugėrikį, užtikrinamos anaerobinės sąlygos, palengvinant veiksmingą bakterijų dauginimąsi. 4 pav. diagramoje paminėta, kad nuolatinė vandenilio gamyba rodo deguonies sugėriklio veiksmingumą, palaikant anaerobines sąlygas. Be to, sacharozės kiekio papildymas rodo gebėjimą įveikti gamybos stabilizavimąsi, todėl padidėja vandenilio išeiga.

Supaprastintas ABM receptas, papildytas deguonies sugėrikliu, yra veiksmingas tvariam bakterijų augimui ir nuolatinei vandenilio dujų gamybai palaikyti.

DNR, esanti sūryme, surinktame iš naftos rezervuarų, buvo amplifikuota naudojant PCR, sekvenuota ir palyginta su žinomomis bakterijų bioinformatinėmis DNR bibliotekomis tipo ir klasės lygiais. DNR iš rezervuaro sūrymo rastos

proteobakterijų, Firmicutes, Bacteroidetes ir Spirochaetes bakterijų sekos tipo lygiu (5 pav.). Tai žinomos vandenilio gamintojos, pavyzdžiui, Clostridia ir Bacilli iš firmikutų tipo, rasti klasės lygiu (6 pav.).

Vandeninio gavybos iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, metodika

Išgaunant vandenilį iš rezervuarų, kuriuose gausu angliavandenilių, naudojama skrupulinga metodika tiksliai dujų kompozicijos analizei ir supratimui užtikrinti. Dujų mėginiai kruopščiai paimami iš naftos rezervuarų ir laikomi steriliose talpyklose, kad būtų išvengta užteršimo. Po to taikomas išsamus analitinis metodas, naudojant pažangias technologijas, tokias kaip izotopų santykio masių spektrometrija (IRMS) ir dujų chromatografija (GC), siekiant išaiškinti surinktų dujų izotopinę ir cheminę kompoziciją.

Dujų kompozicijos analizė (1 lentelė):

Junginys	Tūrinė koncentracija mišinyje [% tūrio]	Tūrinė koncentracija (be oro užterštumo) [% tūrio]
C1	38.13007	38.28366
C2	11.07247	11.11707
C3	14.95245	15.01268
i-C4	2.61052	2.62103
n-C4	8.68477	8.71975
neo-C5	0.02564	0.02575
i-C5	2.838	2.84943
n-C5	4.18616	4.20302

ΣC6	2.81263	2.82396
ΣC7	1.8473	1.85474
ΣC8	0.2159	0.21677
ΣC9	0.00518	0.0052
ΣC10	0.00000	0.00000
CO ₂	4.74865	4.76763
N ₂	7.31892	7.03107
O ₂	0.08496	0.00000
CO	0.00000	0.00000
He	0.188	0.18876
H ₂	0.27833	0.27945
H ₂ S	0.00000	0.00000
Metilmerkaptanas	0.00002	0.00002
Etilmerkaptanas	0.00001	0.00001
Dimetilsulfidas	0.00000	0.00000
i-propilmerkaptanas	<0.00001	<0.00001
n-propilmerkaptanas	<0.00001	<0.00001
i-butilmerkaptanas	<0.00001	<0.00001
n-butilmerkaptanas	<0.00001	<0.00001

1 lentelė

Dujų chromatografija – tai stipri analizės priemonė, naudojama tiksliai cheminei dujų mėginių, paimtų iš gręžinio, kompozicijai nustatyti. Atliekant tokią išsamią analizę nustatyta, kad be kitų sudedamųjų dalių, yra daug vandenilio dujų. Dujų chromatografijos duomenys teikia informaciją apie santykinę įvairių komponentų

gausą dujų fazėje, kurią galima toliau interpretuoti.

Vakarų Lietuvoje esančių naftos rezervuarų izotopinė analizė (2 lentelė)

Kartu su chemine kompozicijos analize atliekama izotopinė analizė vandenilio dujų kilmei dujų fazėse iš netoliese, ypač Vakarų Lietuvoje esančių naftos rezervuarų, nustatyti. Izotopų santykio masių spektrometrija (IRMS) naudojama vandenilio izotopinei kompozicijai nustatyti, ypač sutelkiant dėmesį į $\delta D-H_2$ vertes, kurios yra vandenilio šaltinio indikatoriai. Nustatytos didelės $\delta D-H_2$ vertės rodo biogeninę vandenilio kilmę, kitaip tariant, tai, kad jis greičiausiai atsirado dėl biologinių procesų, susijusių su organinių medžiagų skilimu.

$\delta^{13}C-CO_2$	$\delta^{13}C-C_1$	$\delta D-C_1$	$\delta D-H_2$
-14.4	-50.2	-281	-747
-13.1	-50.8	-275	-742

2 lentelė

Be to, C_1/C_2 anglies santykis, gautas iš dujų chromatografijos duomenų (1 lentelė), dar kartą patvirtina išvadą apie vandenilio biogeninį šaltinį. Didesnis C_1/C_2 anglies santykis atitinka kompoziciją, paprastai siejamą su biogeniniu metanu – tai dar vienas argumentas pagrįsti nuomonei, kad vandenilio dujos yra rezervuaro mikrobinės veiklos šalutinis produktas.

Nors pageidaujami įgyvendinimo pavydžiai buvo parodyti ir aprašyti, suprantama, kad tokiu aprašymu nesiekama apriboti išradimo – jis skirtas aprėpti visoms modifikacijoms ir alternatyvioms konstrukcijoms, atitinkančioms išradimo dvasią ir apimtį.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Vandeniio gamybos iš rezervuaro, kuriame gausu angliavandenilių, kompozicija, apimanti anaerobinės bazinės terpės (ABM) tirpalą su specifinėmis maistinėmis medžiagomis, vitaminais, mikroelementais, aktyviosiomis paviršiaus medžiagomis ir deguonies sugėrikliu, kur minėta kompozicija papildomai apima:

- a. 1,0 - 100,0 g/L NH_4Cl ;
- b. 0,33 g - 33,0 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- c. 0,1 - 10,0 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- d. 0,33 - 33,0 g/L KCl ;
- e. 0,5 - 50,0 g/L KH_2PO_4 ;
- f. 4,0 - 400 g/L mielių ekstrakto;
- g. 0,4 - 40 g/L L-cisteino- $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$;
- h. 0,01 - 1 g/L bent vienos paviršiaus aktyviosios medžiagos; ir
- i. 1 ml/L vitaminų ir mikroelementų tirpalo.

2. Kompozicija pagal 1 punktą, kur mikroelementų tirpalas sudarytas iš mikroelementų, įskaitant, tačiau neapsiribojant nitrilotriacto rūgštimi, MgSO_4 (magnio sulfatu), MnSO_4 (mangano sulfatu), NaCl (natrio chloridu), FeSO_4 (geležies sulfatu), CoCl_2 (kobalto chloridu), ZnSO_4 (cinko sulfatu), CuSO_4 (vario sulfatu), $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (aliuminio kalio sulfatu), H_3BO_3 (boro rūgštimi) ir Na_2MoO_4 (natrio molibdatu).

3. Kompozicija pagal 2 punktą, kur galutinė mikroelementų koncentracija tirpale apima:

- a. 1,5 - 150,0 mg/L nitrilotriacto rūgšties;
- b. 3,0 - 300,0 mg/L MgSO_4 ;
- c. 0,5 - 50,0 mg/L MnSO_4 ;
- d. 1,0 - 100,0 mg/L NaCl ;

- e. 0,1 - 10,0 mg/L FeSO_4 ;
- f. 0,1 - 10,0 mg/L CaCl_2 ;
- g. 0,1 - 10,0 mg/L CoCl_2 ;
- h. 0,1 - 10,0 mg/L ZnSO_4 ;
- i. 0,01 - 1 mg/L CuSO_4 ;
- j. 0,01 - 1 mg/L $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$;
- k. 0,01 - 1 g/L H_3BO_3 ; ir
- l. 0,01 - 1 g/L Na_2MoO_4 .

4. Kompozicija pagal 1 punktą, kur vitaminų tirpalas parinktas iš grupės, apimančios biotino, folio rūgšties, piridoksino hidrochlorido, riboflavino, tiamino, nikotino rūgšties, pantoteno rūgšties, vitamino B12, p-aminobenzenkarboksirūgšties ir tioktinės rūgšties.

5. Kompozicija pagal 4 punktą, kur galutinė vitaminų ir maistinių medžiagų, susijusių su vitaminų tirpalu, koncentracija apima;

- a. 2,0 - 200 $\mu\text{g/L}$ biotino;
- b. 2,0 - 200 mg/L folio rūgšties;
- c. 2,0-200 $\mu\text{g/L}$ piridoksino hidrochlorido;
- d. 10,0 - 1 $\mu\text{g/L}$ riboflavino;
- e. 5,0 - 500 $\mu\text{g/L}$ tiamino;
- f. 5,0 - 500 $\mu\text{g/L}$ nikotino rūgšties;
- g. 5,0 - 500 $\mu\text{g/L}$ pantoteno rūgšties;
- h. 0,1 - 100 $\mu\text{g/L}$ vitamino B12;
- i. 5,0–500 $\mu\text{g/L}$ p-aminobenzenkarboksirūgšties, ir
- j. 5,0 - 500 $\mu\text{g/L}$ tioktinės rūgšties.

6. Kompozicija pagal 1 punktą, kur kompozicija gali apimti angliavandenių šaltinį, įskaitant ir neapsiribojant, cukraus formomis, pavyzdžiui, gliukoze, sacharoze, fruktoze, ir/arba krakmolais, pavyzdžiui, kukurūzų krakmolu, bulvių krakmolu, lanksčiai, be kita ko, įskaitant alternatyvius anglies šaltinius, tokius kaip pramoninis cukrus arba melasa.

7. Kompozicija pagal 1 punktą, kur aktyvioji paviršiaus medžiaga parinkta iš grupės, apimančios anijonines aktyvias paviršiaus medžiagas, katijonines aktyvias paviršiaus medžiagas, cviterionines aktyvias paviršiaus medžiagas, nejonines aktyvias paviršiaus medžiagas ir jų derinius.

8. Kompozicija pagal 1 arba 7 punktą, kur aktyvioji paviršiaus medžiaga, pageidautina yra „Tween 80“.

9. Kompozicija pagal 1 punktą, kur mielių ekstraktas apima įvairius elementus, įskaitant, bet neapsiribojant, aminorūgštimis ir azoto šaltiniais.

10. Kompozicija pagal 1 punktą, papildomai apimanti deguonies sugėrikį anaerobinėms sąlygoms palaikyti, kur minėtas deguonies sugėrikis parinktas iš grupės, be kita ko, apimančios L- 14 cisteiną-HCl-H₂O, natrio sulfatą, eritorbatą, dietilhidroksilaminą (DEHA), hidrochinoną, hidraziną, karbohidrazidą ir metiletilketoksimą (MEKO).

11. Kompozicija pagal 1 arba 10 punktą, kur kompozicijoje naudojamas deguonies sugėrikis yra L-cisteinas-HCl-H₂O.

12. Kompozicija pagal 1 punktą, kur anaerobinės bazinės terpės (ABM) tirpalas pritaikytas palaikyti stabilų pH diapazoną, kuris sąlygoja termofilinių mikroorganizmų augimą ir metabolinį aktyvumą.

13. Kompozicija pagal 12 punktą, kurioje parinkta bent viena maistinė medžiaga, skatinanti mikroorganizmo (mikroorganizmų) augimą rezervuare.

14. Vandenilio gavybos iš rezervuaro, kuriame gausu angliavandenilių, būdas, apimantis šiuos žingsnius:

a) išrenkamas angliavandenilių rezervuaras, apimantis naftos zoną su judriąja vandens faze, kur angliavandenilių rezervuaras turi bent vieną gręžinį, besitęsiantį nuo angliavandenilių rezervuaro paviršiaus iki viršutinės arba apatinės naftos zonos srities;

b) įleidžiama kompozicija, apimanti anaerobinę bazinę terpę (ABM) ir papildomas maistines medžiagas, į bent vieną rezervuaro gręžinį, esant skysčio temperatūrai nuo 60 °C iki mažesnės nei 120 °C ir slėgiui nuo 150 iki 300 barų;

c) gaminamas vandenilį apimantis skystis iš angliavandenilių rezervuaro atidarius angliavandenilių rezervuaro gręžinius, kurie tęsiasi iki rezervuaro naftos zonos viršutinės arba apatinės srities, ir

d) gaminamos vandenilio dujos iš vandenilį apimančio skysčio.

15. Būdas pagal 14 punktą, kur įleidžiamas skystis yra 60–120 °C, pageidautina 70–110 °C temperatūros.

16. Būdas pagal 14 punktą, kur pagal būdą naudojamas skystis įleidžiamas 120–350 barų, pageidautina 150–300 barų slėgio.

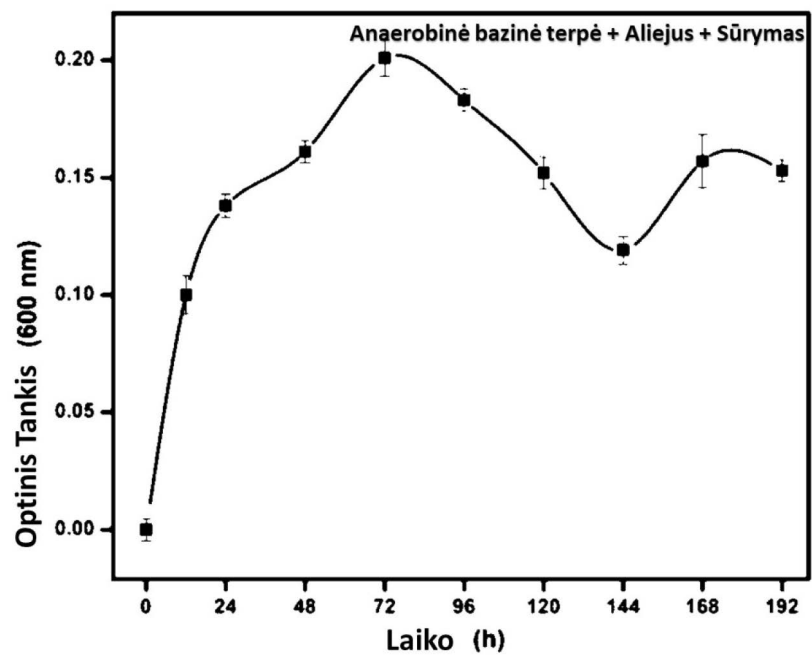
17. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, kur rezervuare yra įdiegtas pH reguliatorius, kuris reguliuoja vandenilį gaminančių mikroorganizmų pH intervale nuo 6,0 iki 8,0.

18. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, kur įleidžiamas skystis apima bent vieno tipo mikroorganizmą, parinktą iš grupės, be kita ko, apimančios termofilinius mikroorganizmus, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ir *Spirochaetes*.

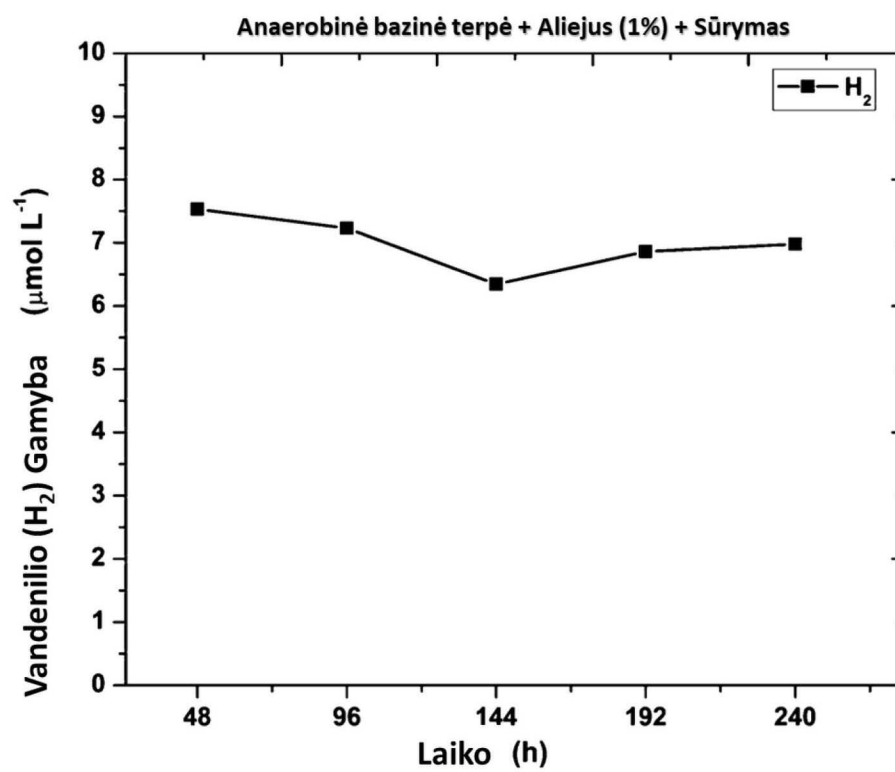
19. Būdas pagal 14 punktą, kur fermentų aktyvumo ir mikrobus populiacijos padidėjimas pasiekiamas, reguliuojant temperatūrą, pH, maistinių medžiagų pasiekiamumą ir pridedant tinkamų augimo stimuliatorių.

20. Būdas pagal 14 punktą, kur į rezervuarą įleisto ABM tirpalo koncentracija optimizuojama, atsižvelgiant į vietinių mikrobus populiacijos savybes ir pageidaujamą vandenilio gamybos greitį.

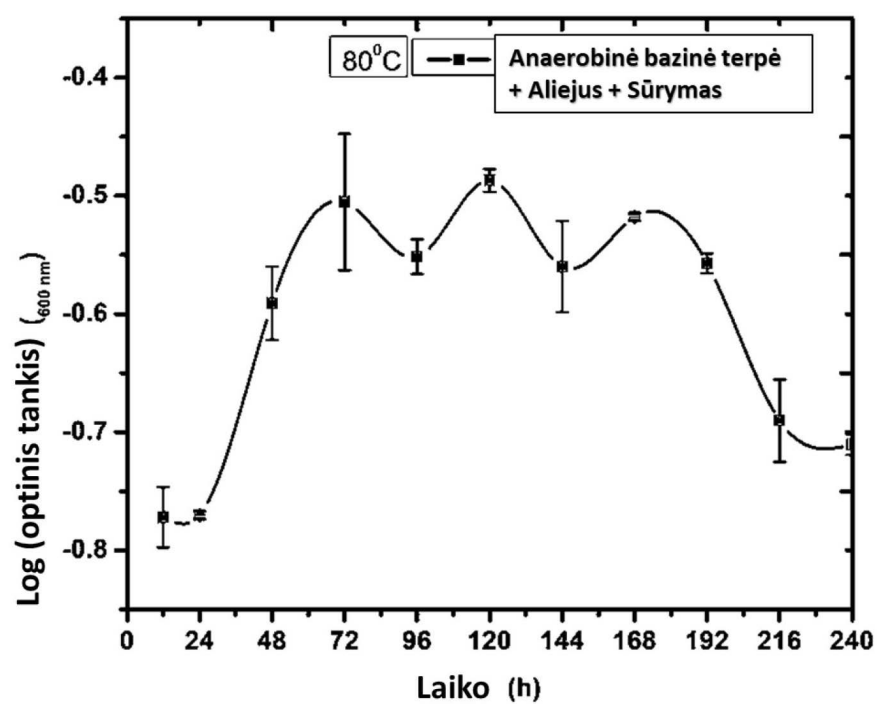
21. Būdas pagal bet kurį iš 14-19 punktų, kur rezervuaras, kuriame gausu angliavandenilių, yra skysčio, kuriame gausu angliavandenilių, įskaitant, tačiau neapsiribojant nafta / bitumu / sunkiąja nafta, rezervuaras.



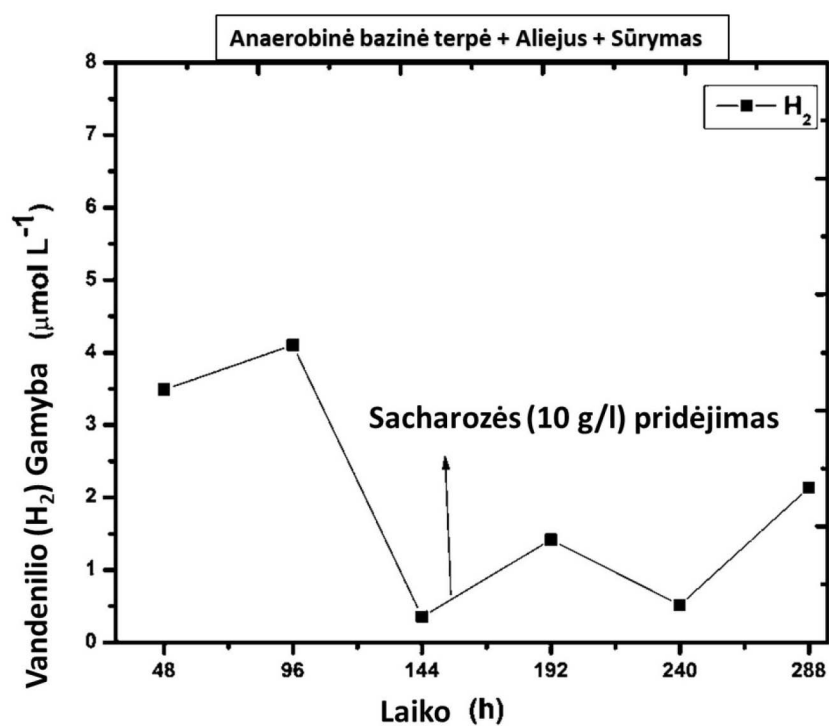
1 pav.



2 pav.



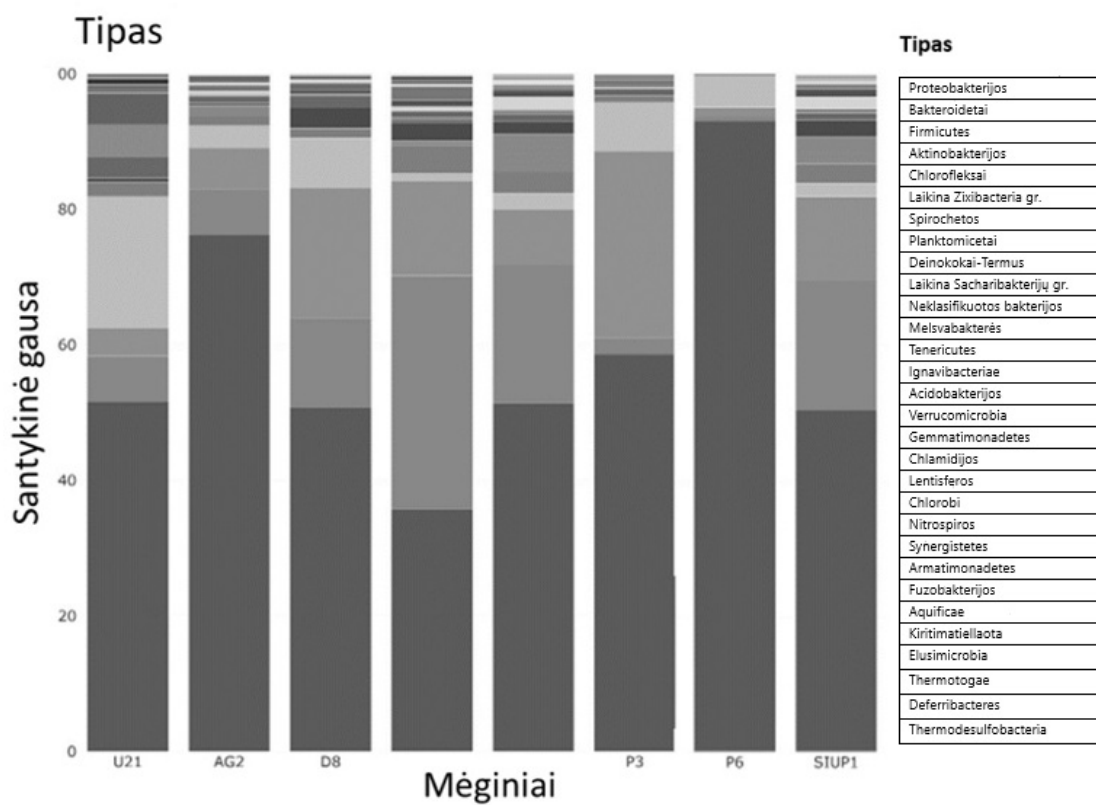
3 pav.



4 pav.

Tipo Lygmens – Taksonominės Analizės Diagrama

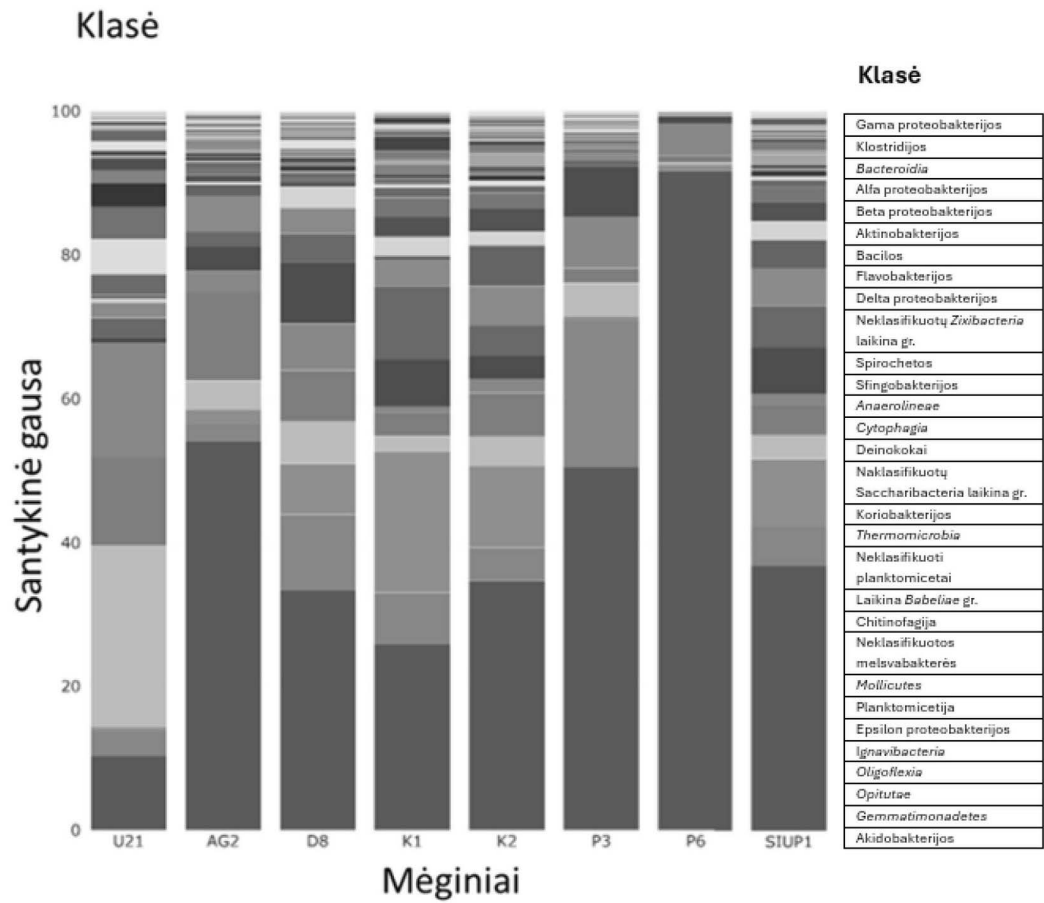
Tipo lygis – taksonomijos grafiko analizė



5 pav.

Klasės Lygmens – Taksonominės Analizės Diagrama

Klasės lygis – taksonomijos grafiko analizė



6 pav.