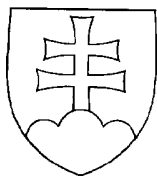


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 941

(21) Číslo prihlášky: **250-97**

(22) Dátum podania: **25.02.97**

(31) Číslo prioritnej prihlášky:

(32) Dátum priority:

(33) Krajina priority:

(40) Dátum zverejnenia: **05.08.98**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **11.06.99**

(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl 6:

C 12N 1/20

C 02F 3/34

C 05F 11/08

(76) Majiteľ a pôvodca patentu: Pollák Arpád, Veľký Meder, SK;

(54) Názov vynálezu: **Spôsob prípravy zmesi mikroorganizmov na viazanie dusíka zo vzduchu, na zvyšovanie rozpustnosti zlúčenín fosforu a na rozklad potravinárskeho olejového sedimentu**

(57) Anotácia:

Spôsob spočíva v tom, že spoločným kultivovaním aspoň dvoch kmeňov mikroorganizmov v živnej pôde bez dusíka s obsahom zlúčenín fosforu sa množia bakteriálne kmene *Azotobacter croococcum* CCM 4642 a *Azospirillum brasiliense* CCM 4644 počas 22 hodín pri teplote 28 °C, potom sa k nim pridá bakteriálny kmeň *Bacillus megatherium* CCM 4643 a bakteriálny kmeň *Pseudomonas putida* CCM 4641 a ďalej sa spoločne kultivujú 44 až 46 hodín pri teplote 28 °C pri prevzdušňovaní 0,6 litrov vzduchu/liter živnej pôdy.

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu prípravy zmesi mikroorganizmov na bakteriálne viazanie dusíka zo vzduchu, na zvyšovanie rozpustnosti vo vode nerozpustného fosforu obsiahnutého v pôde a na bakteriálny rozklad nespracovateľného kalu v oleji vznikajúceho pri výrobe jedlých olejov. Vynález je významný z hľadiska ochrany životného prostredia pomocou pôsobenia metabiózy mikroorganizmov.

Doterajší stav techniky

V niekoľkých posledných desaťročiach sa v poľnohospodárskej výrobe používali prevažne dusíkaté umelé hnojivá. Dosahovali sa tým veľké výnosy úrod. Stále používanie umelých hnojív, ak to nebolo v spojení s použitím maštalného hnojiva, spôsobilo, že sa pôda vplyvom veľkého množstva chemikálií stala kyslá a mikrobiálny život v pôde bol potlačený, pôda sa zhutňovala, zhoršili sa vodné a vzdušné podmienky pôdy. Okrem toho do spodných vôd prenikal škodlivý dusičnan. Pri veľkých dažďoch vodný prúd odpľavil granulované umelé hnojivo do potokov a takto sa dostával dusičnan aj do vodných tokov. Jednorázovým dávkovaním veľkého množstva dusíkatého umelého hnojiva rastliny, najmä záhradné rastliny, prijímali nadmerné množstvo dusičnanu, ktorý negatívne pôsobí na biologický organizmus, najmä zvlášť škodlivo pôsobí dusičnan na dojčatá a malé deti, lebo v krvi vyvoláva methemoglobinémiu, ktorá môže byť aj smrteľná. Preto sa zaviedlo sledovanie obsahu dusičnanov najmä v zelenine a určila sa ich horná prípustná hranica. Ale v praxi sa veľmi ťažko uskutočňuje stála kontrola obsahu dusičnanov v žiaducom širokom rozsahu.

Preto sa dostáva stále viac do popredia praktická možnosť bakteriálneho viazania dusíka zo vzduchu. Podporne pôsobí aj problém zvyšovania cien dusíkatých umelých hnojív v nadväznosti na zvyšovanie cien energií z dôvodu, že výroba dusíkatých umelých hnojív vyžaduje veľké množstvo energie. Po objavení bakteriálneho viazania vzdušného dusíka sa zvyšuje úsilie o využitie dusíka zo vzduchu vo veľkom rozsahu v pôdnom hospodárstve v poľnohospodárskej praxi, najmä v poslednom období.

Známe je viazanie dusíka baktériami rodu *Rhizóbium*, ktoré na koreňoch vikočvetých rastlín, napr. fazule, sóji, ďateliny vytvárajú hľuzy, ktoré viažu dusík zo vzduchu. Toto viazanie dusíka je však ohraničené len pre oblasť vikočvetých rastlín.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody do značnej miery odstraňuje spôsob prípravy zmesi na viazanie dusíka podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v spôsobe využitia niektorých druhov baktérií rodu *Azotobacter*, ktoré sú schopné viazať dusík zo vzduchu tým, že v priebehu ich množenia v pôde, počas ich životnosti, vydiľundujú nimi syntetizované formy dusíka do pôdy ako dusičnany, dusitany, amónium, aminokyseliny, bielkoviny s malými molekulami, ktoré sa viažu na organickú hmotu pôdy odkiaľ ich korene rastlín vstrebávajú. Takto priebežne vznikajúce dusíkaté látky sa nevymývajú z pôdy a neznečisťujú prostredie. Veľkou výho-

dou je, že počas vegetatívneho obdobia je dusík rastlinám dodávaný kontinuálne a harmonicky. Vhodnými druhmi sú bakteriálny kmeň *Azotobacter croococcum* CCM 4642 a bakteriálny kmeň *Azospirillum brasiliense* CCM 4644. Tieto bakteriálne kmene boli uložené v autentizovanej Českej zbierke mikroorganizmov, Bmo, Tvrdého č. 14 pod uvedenými číslami.

Bakteriálny kmeň *Azotobacter croococcum* sa najlepšie množí pri teplote od 16 °C do 30 °C, kým bakteriálny kmeň *Azospirillum brasiliense* má teplotné optimum od 24 °C do 38 °C. Týmto dvoma druhmi kmeňov baktérií sa naočkuje pôda a potom sa kultivujú v pôde zohriatej v jar-nom období na 16 °C a v lete pri teplote pôdy 38 °C. Týmto spôsobom sa zabezpečuje rastlinám harmonické zásobovanie dusíkom.

Ďalej sa v pôde v dôsledku nadmerného používania umelých hnojív s obsahom fosforu nahromadilo veľmi veľa zlúčenín fosforu, ktorý je vo vode nerozpustný, a preto pre rastliny vyžadujúce fosfor je nevyužitelný. Mikroorganizmus rodu *Bacillus megatherium* CCM 4643, ktorý bol uložený v autentizovanej Českej zbierke mikroorganizmov, Bmo, Tvrdého č. 14 pod uvedeným číslom, je schopný, v rámci svojho energetického metabolizmu meniť zlúčeniny fosforu s veľkými molekulami, ktoré sú vo vode nerozpustné na zlúčeniny fosforu vo vode rozpustné, a tým zásobovať pôdu, pre rastliny využiteľnými, rozpustnými zlúčeninami fosforu.

Naočkovaním pôdy kmeňmi mikroorganizmov viažúcich dusík a súčasným naočkovaním pôdy kmeňmi mikroorganizmov rozkladajúcich nerozpustné zlúčeniny fosforu vzniká takzvaná metabióza, kde viazače dusíka dodávajú potrebný dusík a mikroorganizmus *Bacillus megatherium* premieňa nerozpustné zlúčeniny fosforu na zlúčeniny fosforu vo vode rozpustné, pričom obidva druhy baktérií získavajú energiu, potrebnú na vlastný rast a množenie a zároveň dodávajú dusík a fosfor rastlinám.

Pri výrobe jedlých olejov vzniká najmä na konci výroby olejový kal, ktorý sa už nedá ďalej čistiť, nie je vhodný na použitie v potravinárskom priemysle ani na iné využitie napr. v automobilovom priemysle. Likvidácia tohto olejového kalu nemôže prebiehať voľne v životnom prostredí, preto sú na jeho likvidáciu potrebné neutralizačné a čistiace zariadenia. Preto je výhodné využívať opísanú vlastnosť mikroorganizmov kmeňa baktérie *Pseudomonas putida* CCM 4641, ktorý bol uložený v autentizovanej Českej zbierke mikroorganizmov, Bmo, Tvrdého č. 14 pod uvedeným číslom. Tieto mikroorganizmy svojím pôsobením rozkladajú olejové zlúčeniny s otvoreným uhlíkovodíkovým reťazcom na glycerín a organické kyseliny.

Olejový kal sa zmieša s úrodnou pôdou a táto zmes sa naočkuje kultúrami *Azotobacter croococcum*, *Azospirillum brasiliense*, *Bacillus megatherium* a potom aj kultúrou *Pseudomonas putida*, zmes sa niekoľkokrát premieša, obsah olejového kalu sa za dva-tri mesiace mineralizuje a rozkladá. Po aplikácii na ornú pôdu spolu s veľkým množstvom mikróbov predstavuje výživnú látku s charakteristickými vlastnosťami maštalného hnojiva.

Vynález je možné využiť tak, že hustá biomasa mikroorganizmov *Azospirillum brasiliense*, *Azotobacter croococcum* a *Bacillus megatherium* sa po nariadení na vhodnú koncentráciu v množstve desať litrov na hektár rozprašuje na pôdu, potom sa pôda prevracia do hĺbky sejby, čím sa pôda zároveň naočkuje tak, že sa môže čiastočne alebo i

úplne upustiť od použitia umelých hnojív s obsahom dusíka a fosforu.

Ďalej sa môže k uvedeným trom kultúram mikroorganizmov pridať ešte ďalšia kultúra mikroorganizmu *Pseudomonas putida*, a zmes sa používa tak, že na 10 ton pôdy sa pridá 10 litrov vhodne nariadenej zmesi mikroorganizmov a pôda sa viackrát premieša. Touto metódou sa môže rozložiť 500 litrov olejového kalu. Výsledným produktom spôsobu podľa vynálezu je výživná zmes bohatá na mikroorganizmy viažuce dusík, rozkladajúce fosfor a olejový sediment. Tento štvorkomponentový prípravok sa môže použiť ako náhrada za umelé hnojivo.

Podstatou vynálezu je spôsob výroby zmesi mikroorganizmov na viazanie dusíka zo vzduchu, zvyšovanie rozpustnosti nerozpustného fosforu v pôde a mineralizáciu kalu z jedlého oleja.

Podľa vynálezu sa bakteriálny kmeň *Azotobacter croococcum* CCM 4642 množí na živnej pôde, ktorá neobsahuje organický ani anorganický dusík, submerznou fermentáciou pri teplote okolo 28 °C počas 22 hodín, potom sa ferment *Azobacteru* naočkuje 10 % -mi 22 hodinového inokula kmeňa baktérie *Pseudomonas putida* CCM 4641. Mikroorganizmus rodu *Azobacter* počas 22 hodín naprodukuje do fermentačného média toľko dusíka koľko potrebuje mikroorganizmus rodu *Pseudomonas* k svojmu rastu. V dvojitej fermentácii sa pokračuje ešte 22 - 24 hodín, pri prevzdušňovaní 0,6 litrov vzduchu na liter živnej pôdy, pri počte otáčok 120/min. a pri teplote 28 °C. Po ukončení kultivácie, po uplynutí 44 - 46 hodín, je pH kultivačnej pôdy v rozmedzí 7,5 - 8,5 a nárast 4 - 6 miliárd buniek/ml. média kmeňa *Azotobacter croococcum* a 150 - 200 miliónov buniek/ml. kmeňa *Pseudomonas putida*.

Ďalej podľa vynálezu sa bakteriálny kmeň *Azospirillum brasiliense* CCM 4644 množí na živnej pôde, ktorá neobsahuje organický ani anorganický zdroj dusíka fermentáciou pri teplote 28 °C počas 22 hodín, potom sa pomnožená kultúra mikroorganizmu *Azospirillum brasiliense* naočkuje 10 % -mi 22 hodinového inokula kmeňa baktérií *Bacillus megatherium* CCM 4643, pričom bakteriálny kmeň *Azospirillum brasiliense* do toho času naprodukuje do živného média toľko dusíka, koľko potrebuje mikroorganizmus *Bacillus megatherium* na svoj rast. V dvojitej submerznej fermentácii sa pokračuje ešte 22 - 24 hodín pri prevzdušňovaní 1 liter vzduchu na 1 liter fermentačného média pri počte otáčok 120/minútu a pri teplote 28 °C. Po ukončení fermentácie je pH fermentačného média 6,8 - 8,5 a nárast kmeňa *Azospirillum brasiliense* 4 - 6 miliárd buniek/ml média a kmeňa *Bacillus megatherium* 200 - 300 miliónov buniek/ml média.

Pri technickej realizácii vynálezu nevzniká žiadny vedľajší produkt. Biomasa mikroorganizmov sa môže využívať ako ferment, ktorý sa už ďalej nijako nespracováva. Voda z umývania fermentorov sa môže dostať do kanalizácie, pretože výhodne obohacuje vodu niek vzácnymi druhmi baktérií.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Do banky sa dá 200 ml zmesi zloženia dihydrogenfosforečnan draselný 0,3 g, chlorid vápenatý 0,2 g, síran horečnatý 0,3 g, síran draselný 0,2 g, chlorid sodný 0,4 g,

chlorid železitý 0,05 g, uhličitan vápenatý 5,0 g, melasa 30,0 g, skvasiteľný cukor 10,0 g na 1000 ml živnej pôdy a počas 40 minút sa pôda sterilizuje pri teplote 125 °C, potom sa pridá 1 ml roztoku stopových prvkov zloženia kyselina bóritá 5,0 g, molybdénan amónny 6,0 g, jodid draselný 0,5 g, bromid sodný 0,5 g, síran zinočnatý 0,3 g, síran hlinitý 0,3 g na 1000 ml živnej pôdy. Do obsahu lyofylozovanej ampulky oboch bakteriálnych kmeňov *Azotobacter croococcum* a *Azospirillum brasiliense* sa pridá 5 ml sterilizovanej vody a vytvorí sa suspenzia, 1,0 ml -om suspenzie sa naočkujú obidve banky. Naočkovanie banky sa položia na horizontálne trepacie zariadenie a kultivujú sa pri teplote 28 °C a pri počte otáčok 160 za minútu počas 48 - 72 hodín, do vytvorenia dostatočného nárastu biomasy. Takto sa pripraví základné inokulum.

Ďalej 400 ml živnej pôdy uvedeného zloženia sa dá do banky a naočkuje sa 3 - 4 ml -mi základného inokula a kultivuje sa na horizontálnom trepacom zariadení pri teplote 28 °C počas 48 hodín. Takto sa získa prípravné inokulum.

Ďalej 1000 litrov živnej pôdy sa sterilizuje vo fermentore pri 125 °C počas 40 minút, po ochladení sa naočkuje 1,6 l -mi prípravného inokula. Naočkovávaná pôda sa fermentuje počas 22 hodín pri teplote 28 °C za prevzdušňovania 0,6 litra vzduchu na 1 liter fermentačného média, pri počte otáčok 120 za minútu. Takto sa získa z oboch druhov mikroorganizmov prevádzkové inokulum vhodnej konzistencie. Na zamedzenie tvorby peny sa pridá odpeňovač v množstve 0,2 - 1,0 litrov/m³. Hodnota pH živnej pôdy je v rozsahu 6,8 - 7,0.

Príklad 2

Do banky sa dá 200 ml živnej pôdy zloženia dihydrogenfosforečnan draselný 0,3 g, chlorid vápenatý 0,2 g, síran horečnatý 0,3 g, melasa 30,0 g, coom - steep 0,5 g, peptón 0,3 g, uhličitan vápenatý 5,0 g a počas 40 minút sterilizujeme pri 125 °C.

Do obsahu lyofylozovanej ampulky oboch bakteriálnych kmeňov *Bacillus megatherium* a *Pseudomonas putida* sa pridá 5 ml sterilizovanej vody a vytvorí sa suspenzia, potom 1,0 ml -om suspenzie sa naočkujú obidve banky. Naočkovanie banky sa položia na horizontálne trepacie zariadenie a kultivujú sa pri teplote 28 °C počas 48 hodín pri počte otáčok 160 za minútu.

Ďalej 400 ml uvedenej živnej pôdy sa dá do banky a naočkuje sa 1 - 2 ml -mi základného inokula a mieša sa na horizontálnom trepacom zariadení pri teplote 28 °C počas 24 - 48 hodín, pričom mikroskopickým sledovaním sa zisťuje vegetatívny stav kultúry a vznik spór. Týmto postupom sa získa prípravné inokulum.

Ďalej 1000 litrov živnej pôdy sa sterilizuje vo fermentore pri 125 °C počas 40 minút, po ochladení sa naočkuje 3 kusmi prípravného inokula s obsahom 400 ml. Naočkovávaná pôda sa fermentuje počas 22 hodín pri teplote 28 °C za prevzdušňovania 0,6 litrov vzduchu na 1 liter živnej pôdy, pri počte otáčok 120 za minútu. Na zamedzenie tvorby peny sa pridá odpeňovač v množstve 0,2 - 1,0 litrov/m³. Mikroskopicky sa sleduje nárast kultúry tak, aby prebiehal len do vegetatívneho stavu bez tvorby spór. Hodnota pH živnej pôdy je v rozsahu 6,8 - 7,0.

Príklad 3

V dvoch fermentoroch s celkovým obsahom 10 - 12 m³, jednotlivého užitočného objemu 5,0 - 6,0 m³, sa sterilizuje 4,5 a 4,5 m³ živnej pôdy bez obsahu dusíka, opísanej v príklade 1 a naočkuje sa 10 % -mi prevádzkového inokula s obsahom bakteriálneho kmeňa *Azotobacter croococcum* podľa príkladu 2. Potom sa kultivuje pri teplote 28 °C počas 22 hodín za súčasného prevzdušňovania 0,6 litrov vzduchu na liter živnej pôdy, pri počte otáčok 120 za minútu. Potom sa fermentovaná pôda naočkuje ešte 10 % -mi kultúry mikroorganizmu *Pseudomonas putida* podľa príkladu 2, a ďalej sa pokračuje v dvojitej fermentácii ešte 22 - 24 hodín. Po ukončení 44 - 46 hodinovej fermentácie je pH živnej pôdy 7,7 - 8,5 a bakteriálny kmeň *Azotobacter croococcum* dosiahol nárast 4 - 8 miliárd buniek /ml média a kmeň *Pseudomonas putida* 200 - 300 miliónov buniek/ml média.

Do dvoch fermentorov s užitočným objemom 5,5 - 6,0 m³ sa vloží 4,5 a 4,5 m³ živnej pôdy bez dusíka opísanej v príklade 1 a naočkuje sa 10 % -mi prevádzkového inokula s obsahom bakteriálneho kmeňa *Azospirillum brasiliense* podľa príkladu 1, kultivácia trvá 22 hodín pri teplote 28 °C pri prevzdušňovaní 0,6 litrov vzduchu na liter živnej pôdy, pri počte otáčok 120 za minútu. Fermentačné médium sa potom naočkuje ešte 10 % -mi prevádzkového inokula kultúry mikroorganizmu *Bacillus megatherium* podľa príkladu 1, a ďalej sa pokračuje v dvojitej fermentácii ešte 22 - 24 hodín. Po ukončení fermentácie je pH fermentačného média 7,5 - 8,5 a kmeň *Azospirillum brasiliense* dosiahol nárast 4 - 6 miliárd buniek /ml média a kmeň *Bacillus megatherium* 200 - 300 miliónov buniek/ml média.

Ďalej zmiešaním oboch typov fermentov a ich homogenizovaním sa získa štvorzložkový výsledný produkt zloženia: *Azotobacter croococcum* 2 - 4 miliárd buniek/ml, *Azospirillum brasiliense* 2 - 4 miliárd buniek/ml, *Pseudomonas putida* 150 - 200 miliónov buniek/ml a *Bacillus megatherium* 150 - 200 miliónov buniek/ml, pričom v množnej biomase je celkom 4,3 miliárd buniek/ml až 8,4 miliárd buniek/ml živného média a pH je v rozmedzí 7,5 - 8,5.

Priemyselná využiteľnosť

Opísaným spôsobom podľa vynálezu sa pripraví zmes mikroorganizmov na viazanie dusíka zo vzduchu, na zvyšovanie rozpustnosti zlúčenín fosforu vo vode a na rozklad potravinárskeho olejového sedimentu, ktorá má využitie v poľnohospodárstve.

PATENTOVÉ NÁROKY

Spôsob prípravy zmesi mikroorganizmov na viazanie dusíka zo vzduchu, na zvyšovanie rozpustnosti zlúčenín fosforu a na rozklad potravinárskeho olejového sedimentu, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že spoločnou kultiváciou aspoň dvoch kmeňov mikroorganizmov v živnej pôde bez dusíka s obsahom zlúčenín fosforu sa množia bakteriálne kmene *Azotobacter croococcum* CCM4642 a *Azospirillum brasiliense* CCM 4644 počas 22 hodín pri teplote 28 °C, potom sa k nim pridá bakteriálny kmeň *Bacillus megatherium* CCM 4643 a kmeň *Pseudomonas putida* CCM 4641, a potom sa spoločne kultivujú 44 až 46 ho-

dín pri teplote 28 °C pri prevzdušňovaní 0,6 litrov vzduchu na liter živnej pôdy.

Koniec dokumentu
