

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-156**
(22) Přihlášeno: **06.03.2012**
(40) Zveřejněno: **20.11.2013**
(Věstník č. 47/2013)
(47) Uděleno: **09.10.2013**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **20.11.2013**
(Věstník č. 47/2013)

(11) Číslo dokumentu:

304 147

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
B09C 1/10 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
A62D 3/02 (2007.01)
C12S 1/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

CZ 283310 B6; CZ 283226 B6; CZ 2206-94 A3; CN 101722181 A; CN 1663702 A; KR 101018026 B.
ALARCÓN ET AL, Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil, International Journal of Phytoremediation, Volume 10, Issue 4, 2008, abstrakt.

(73) Majitel patentu:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 6 -
Dejvice, CZ
Tesoro spin off, spol. s r. o., Přelíc, CZ
ESTER, spol. s r. o., Praha 4 - Háje, CZ

(72) Původce:

Marek Miroslav, Praha 4 - Chodov, CZ
Horsáková Iveta, Mladá Boleslav - Debrž, CZ
Vrba Peter, 84107 Bratislava 4, SK
Marek Aleš, Říčany - Kuří, CZ

(54) Název vynálezu:

**Způsob remediacce a rekultivace
kontaminovaných ploch pomocí
mikroorganismů a mykorhizních hub**

(57) Anotace:

Způsob remediacce a rekultivace lokalit s ekologickými zátěžemi s půdou kontaminovanou organickými polutanty ropného a koksochemického původu se provádí pomocí kultur mikroorganismů využívajících tyto polutanty se současnou nebo následnou rekultivací realizovanou výsadbou stromků ve spojení s aplikací mykorhizních hub a podsevem leguminózními rostlinami inokulovanými rhizosférickými bakteriemi fixujícími na kořenech těchto rostlin atmosférický dusík. Způsob poskytuje možnost výrazným způsobem zvyšovat ujmavost, vitalitu a růst vysazovaných stromků na ekologicky zatížených lokalitách a tím i urychlovat proces zalesňování exponovaných ploch přispívající ke zlepšení životního prostředí.

CZ 304147 B6

Způsob remedie a rekultivace kontaminovaných ploch pomocí mikroorganismů a mykorhizních hub

5 Oblast techniky

V důsledku ekonomických změn dochází postupně k nárůstu lesnických rekultivací na plochách s ekologickou zátěží, kde je v důsledku předchozí důlní činnosti a/nebo kontaminace zemin různými polutanty z ekologicky zatěžujících technologií prostředí velice nepříznivé pro uchycení a následný růst výsadbových dřevin. Z těchto důvodů je velice aktuální hledání způsobů ke zlepšení kvality výsypkových zemin (případně lokalit s předmětnou ekologickou zátěží) a způsobů výsadby a pěstování dřevin při zalesňování těchto lokalit včetně jejich ochrany před erozí.

15 Dosavadní stav techniky

Při lesnických rekultivacích na lokalitách s ekologickou zátěží, především na odvalech a výsypkách po těžbě uhlí nebo jiných surovin, je možno aplikovat překrytí povrchu lokality vrstvou zeminy s dostatkem humusu a půdní mikroflóry. Tento způsob je však ekonomicky značně náročný, proto se alternativně zlepšuje struktura půdy dodáním organické hmoty formou zeleného hnojení.

Další možností je uplatnění mykorhizy inokulací výsadbového materiálu mykorhizními houbami, které v symbióze s vysazenými stromky napomáhají jejich růstu. Mykorhizní houby mohou pomocí extramatrikálních hyf využívat mnohem větší objem půdy než kořenové vlášení samotných vysazovaných rostlin, v důsledku čehož je příjem vody a minerálních živin u kořenů s mykorhizou signifikantně vyšší než bez mykorhizy. Minerální živiny jsou předávány hostitelské rostlině, od které houba obdrží sacharidy, nezbytné pro její další růst a vývoj. Po kolonizaci kořenů mykorhizní houbou je rychle stimulován růst hostitelské rostliny, rozvoj mykorhizy a stimulace růstu nadzemní části rostliny jsou tedy v přímé závislosti.

Na lokalitách s kontaminovanou zeminou v důsledku havárií nebo využívání životního prostředí zatěžujících technologií je nutno provést i patřičnou dekontaminaci zemin, aby nedocházelo ke kontaminaci podzemních vod. V případě kontaminací organickými látkami ropného nebo koksochemického původu se tyto polutanty mohou odstraňovat bioremediačními postupy založenými na aplikaci vhodných mikroorganismů schopných využít uvedený typ kontaminantů.

Podstata vynálezu

Způsob využití mikroorganismů a mykorhizních hub při remediačních a rekultivačních pracích spočívá v kombinaci různých typů mikroorganismů a mykorhizních hub umožňující jednak vyčištění výsadbové lokality od kontaminujících látek ropného nebo koksochemického původu a ke zlepšení podmínek k uchycení a růstu vysazovaných stromků na zátěžových lokalitách s nedostatkem humusu, půdní mikroflóry a podzemní vody. Navození těchto zlepšených podmínek je docíleno využitím ektomykorhizních nebo endomykorhizních hub v kombinaci s aplikací podsevu leguminózními rostlinami společně s využitím rhizosférických bakterií umožňujících fixaci atmosférického dusíku. Pro lepší „hospodaření s vodou“ jsou k výsadbovému materiálu přidávány hydrokoloidy mající schopnost zadržet přes 80 % vody a dále humínové látky, perlit nebo jiný porézní materiál, rašelina a drcená borka přispívající i k snazšímu růstu vysazovaných rostlin, mykorhizních hub i aplikovaných bakterií.

Při bioremediačních pracích se způsobem dle vynálezu využívá schopnosti mikroorganismů, s výhodou rodu *Acinetobacter* a *Klebsiella*, využít nepolární látky ropného a koksochemického původu. Směsná kultura těchto mikroorganismů se kultivuje 24 až 48 hodin v kultivačních

baňkách nebo ve vzdušném fermentoru při 28 až 38 °C v základním živném médiu obsahujícím jako hlavní složku pepton a hovězí extrakt a poté se nakultivovaná biomasa aplikuje na plochu s kontaminovanou zemínou nebo se ve formě imobilizovaných mikrobiálních buněk v průtočném bioreaktoru využije k čištění kontaminované vody čerpané z vystrojených vrtů na lokalitě se zemínou kontaminovanou organickými látkami ropného nebo koksochemického původu a vyčištěná voda vytékající z průtočného bioreaktoru se nechá vsakovat do nadloží s kontaminovanou zemínou.

Současně nebo následně se na dané lokalitě způsobem dle vynálezu provede výsev leguminózních rostlin (např. pelušky, hrachu, komonice a jetele) a k těmto rostlinám se přidá biomasa rhizosferních bakterií, např. rodu *Agrobacterium* nebo *Azotobacter*, nakultivovaná v baňkách nebo ve vzdušném fermentoru při 28 až 38 °C v základním živném médiu. Přídavek rhizosferních bakterií se provádí přímo ve formě kultivačního media s narostlou biomasou mikroorganismů nebo po převedení do suché formy na sprayové sušárně nebo lyofilizací. Výsev leguminózních rostlin na dané lokalitě je možno realizovat po výsadbě dřevin určených k zalesňování nebo s výhodou ještě před touto výsadbou. Provedený podsev těmito rostlinami nejenom zvyšuje ujímatelnost vysazovaných dřevin a následně urychlení jejich růstu, zároveň však výrazným způsobem zabraňuje erozi půdy v dané lokalitě.

Při vlastní výsadbě dřevin určených k zalesňování dané lokality se tyto rostliny inokulují ekto- nebo endomykorhizními houbami buď již v lesní školce, nebo při vlastní výsadbě dřevin na dané lokalitě. Způsobem podle vynálezu se biomasa ektomykorhizních hub (např. rodu *Boletus*, *Paxillus*, *Suillus*, *Laccaria*, *Russula*, *Cortinarius*, *Lactarius*, *Entoloma*, *Hebeloma*, *Lepista*, *Gymnopilus*, *Crucibulum*, *Agaricus*, *Hypholoma*, *Macrolepiota*, *Morchella* a *Sparassis*) připravuje kultivací za aerobních podmínek ve sladinném tekutém médiu nebo v bramborovo-sójovém bujónu při 15 až 25 °C po dobu 14 dnů v temnu. Nakultivovaná biomasa ektomykorhizních hub se použije přímo ve formě kultivačního media s narostlou biomasou, nebo se předem převede do suché formy na sprayové sušárně nebo lyofilizací. V případě endomykorhizních hub se příslušné mycelium hub, např. rodu *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora* nebo *Sclerocystis*, pěstuje na hostitelské rostlině, např. na kukuřici, kultivované hydroponicky ve směsi perlitu a písku v hmotnostním poměru 4 ku 1 až 1 ku 3 po přidavku spor nebo inokula pěstovaných endomykorhizních hub a vytvořené mycelium ve formě substrátu s fragmenty kořenů hostitelské rostliny s hyfami a spory endomykorhizních hub se použije jako přídavek k výsadbovému materiálu. Ektomykorhizní houby se zpravidla přidávají k výsadbovému materiálu na bázi jehličnanů, zatímco endomykorhizní houby nalézají uplatnění při výsadbě a růstu listnatých stromků a jiných rostlin.

Nakultivované mykorhizní houby se způsobem dle vynálezu přidávají k osivu nebo k výsadbovému materiálu ve školkách s výhodou společně s rašelinou a/nebo drcenou borkou a/nebo anorganickým porézním aditivem jako je perlit a/nebo hydrokoloidem na bázi syntetického hydrogelu nebo přírodních polysacharidů a/nebo humínových látek nebo se přidávají k vysazovaným stromkům ve formě fixačního gelu na bázi syntetického hydrogelu nebo přírodních polysacharidů s výhodou obsahujícího rašelinu a/nebo drcenou borku a/nebo anorganické porézní aditivum jako je perlit a/nebo humínové látky a/nebo aminokyseliny a/nebo oligopeptidy a/nebo bílkoviny a/nebo hořečnatá nebo vápenatá hnojiva. Aplikace biomasy mykorhizních hub společně s fixačním gelem obsahujícím uvedené komponenty je výhodná nejenom z důvodu podpory ujímání vysazovaných rostlin a jejich následného růstu v důsledku probíhající symbiosy s mykorhizními houbami, ale přítomnost hydrogelu fixujícího až 80 % vody zajišťuje pro pěstované stromky potřebné množství vody.

Použití hydrogelu je velice jednoduché. Svazek výsadbového materiálu nebo jednotlivé rostliny se před výsadbou ponoří do předemtného gelu, který velmi snadno ulpívá na kořenech vysazovaných rostlin, které se poté přímo vysazují. Obalení kořenů fixačním gelem zabraňuje vysychání rostlin, což výrazně napomáhá udržování kvalitního výsadbového materiálu po vytěžení ve školkách během dopravy, případně i skladování před vlastní výsadbou.

Při probíhající symbiose dochází k vzájemnému ovlivňování výměny živin mezi mykorhizní houbou a hostitelskou rostlinou, přičemž tyto fyziologické procesy se projevují především v koloběhu živin v ekosystémech. Mykorhizace rostlin může omezovat i výskyt některých chorob a škůdců napadajících kořeny vysazovaných rostlin, mykorhizované rostliny jsou rovněž odolné proti některým virózám pravděpodobně v důsledku nepřímého vlivu zlepšené výživy mykorhizovaných rostlin.

Dalšího zvýšení efektivity prací při zalesňování lokalit s ekologickou zátěží, zvláště tam, kde je velké nebezpečí eroze, je možno dosáhnout podsevem leguminózními rostlinami v kombinaci se specifickými nitrogenními bakteriemi (rhizobii), které jsou jedním z partnerů symbiózy leguminóz. Pěstování jetelů, komonice nebo pelušky jako podpůrných rostlin lesní výsadby s přidáním biomasy nitrogenních mikroorganismů, např. rodu *Agrobacterium* nebo *Azotobacter*, na lokalitách s ekologickou zátěží umožňuje fixaci atmosférického dusíku, čímž přispívá k obohacování živinami potřebnými pro růst nejenom leguminózních rostlin. Tímto způsobem je možno snižovat dávky minerálních hnojiv, které se při rekultivacích používají. Při využití leguminózních rostlin inokulovaných rhizobii se ušetří jak náklady na hnojení dusíkatými hnojivy, tak i náklady na hnojení hnojivy fosforečnými. Používané kmeny rhizobií mají totiž schopnost nejenom fixovat atmosférický dusík, ale pomocí své P-solubilizační aktivity uvolňují fosfor z těžko rozpustných fosforečných sloučenin a tím ho činí pro rostliny dostupný a využitelný. Fosfor zastává důležitou roli také při biologické fixaci atmosférického dusíku, neboť je nezbytný k nodulaci (tvorbě hlízek) i k procesu samotné fixace dusíku. Při dostatku dostupného fosforu se zvyšuje počet i hmotnost hlízek, a také celková nitrogenázová aktivita.

Způsob využití mikroorganismů a mykorhizních hub při remediačních a rekultivačních pracích podle vynálezu poskytuje možnost výrazným způsobem zvyšovat ujmavost, vitalitu a růst vysazovaných stromků (při současném snížení ztrát výsadbového materiálu) na ekologicky zatížených lokalitách (jako jsou odvaly a výsypky po důlní činnosti, imisní holiny a lokality po provozu ekologicky zatěžujících technologií) a tím i urychlovat proces zalesňování exponovaných ploch přispívající k zlepšení životního prostředí.

Vynález je dokumentován příklady použití, aniž by se jimi omezoval.

35 Příklady provedení

Příklad 1

40 Ve vzdušném fermentoru se nakultivuje směsná kultura mikroorganismů využívajících organické polutanty nebo koksochemického původu, např. rodu *Acinetobacter* a *Klebsiella*, v základním živném médiu obsahujícím jako hlavní složku pepton a hovězí extrakt při 28 až 38 °C po dobu 24 až 48 hodin. Nakultivovaná biomasa se poté aplikuje postřikem ve formě suspenze na plochu s provzdušněnou zemínou kontaminovanou organickými polutanty ropného nebo koksochemického původu. Po snížení obsahu příslušných kontaminantů pod stanovenou mez se plocha oseje leguminózními rostlinami za přídavku specifických nitrogenních bakterií (rhizobií) předem nakultivovaných ve vzdušném fermentoru při 28 až 38 °C v základním živném médiu. Před výsevem se semena leguminóz, např. jetele, komonice nebo pelušky, obalí kultivačním médiem s vytvořenou biomasou za přídavku melasy nebo gelu vytvořeného z přírodních polysacharidů.

50 Při následném zalesňování dané lokality se k výsadbě použijí stromky, které byly již ve školce inokulované vhodnými mykorhizními houbami. V případě ektomykorhizních hub se tyto kultivují ve sladinném tekutém médiu nebo v bramborovo-sójovém bujónu při 15 až 25 °C po dobu 14 dnů. Nakultivovaná biomasa ektomykorhizních hub (např. rodu *Boletus*, *Paxillus*, *Suillus*, *Laccaria*, *Russula*, *Cortinarius*, *Lactarius*, *Entoloma*, *Hebeloma*, *Lepista*, *Gymnopilus*, *Crucibulum*,

Agaricus, *Hypholoma*, *Macrolepiota*, *Morchella* a *Sparassis*) se přidá ve formě suspenze kultivačního média k semenům nebo malým výpěstkům sazenic, případně se předem převede do suché formy na sprayové sušárně nebo lyofilizaci a následně se použije k inokulaci.

- 5 V případě endomykorhizních hub, např. rodu *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora* nebo *Sclerocystis*, se mycelium příslušné houby pěstuje na hostitelské rostlině, např. na kukuřici, kultivované hydroponicky ve směsi perlitu a písku v hmotnostním poměru 4 ku 1 až 1 ku 3 po přidavku spor nebo inokula pěstovaných endomykorhizních hub. Vytvořené mycelium ve formě substrátu s fragmenty kořenů hostitelské rostliny s hyfami a spory endomykorhizních hub se použije
10 jako přídatek k výsadbovému materiálu.

Příklad 2

- 15 V kultivačních baňkách se kultivuje směsná kultura mikroorganismů využívajících organické polutanty ropného nebo koksochemického původu v základním živném médiu obsahujícím jako hlavní složku pepton a hovězí extrakt při 28 až 38 °C po dobu 24 až 48 hodin. Nakultivovaná biomasa se ve formě imobilizovaných mikrobiálních buněk využije v průtočném bioreaktoru k čištění kontaminované vody čerpané z vystrojených vrtů na lokalitě se zeminou kontaminovanou
20 organickými látkami ropného nebo koksochemického původu a vyčištěná voda vytékající z průtočného bioreaktoru se nechá vsakovat do nadloží s kontaminovanou zeminou. Lokalita s kontaminovanou zeminou čištěnou uvedeným způsobem se oseje leguminózními rostlinami za přidavku rhizosférických bakterií nakultivovaných v kultivačních baňkách za podmínek uvedených v příkladu 1, následně usušených na sprayové sušárně a poté přidáných do fixačního gelu vytvořeného
25 z přírodních polysacharidů na bázi pektátů, alginátů nebo karagenanů.

K zalesňování se používá výsadbový materiál inokulovaný s výhodou již v lesní školce ektomykorhizními nebo endomykorhizními houbami (v závislosti na druhu vysazovaných stromků).

30

Příklad 3

- Směs vytvořená z 5 % hmotn. napěstovaného mycelia ektomykorhizních hub, 25 % hmotn. rašeliny, 20 % hmotn. drcené borky, 15 % hmotn. porézního anorganického substrátu, 10 %
35 hmotn. humínových látek, 10 % hmotn. oligo- nebo polysacharidů, 5 % hmotn. aminokyselin nebo oligopeptidů, 5 % hmotn. bílkovin, 5 % hmotn. hořčnatých nebo vápenatých hnojiv se přidá do kultivačního substrátu při výsevu semen 1 až 5 cm pod semena nebo do jamky při přesazování rostlin způsobem zabezpečujícím kontakt s kořeny rostlin.

40

Příklad 4

- Směs vytvořená z 85 % hmotn. napěstovaného mycelia ektomykorhizních hub, 5 % hmotn. rašeliny, 3 % hmotn. drcené borky, 2 % hmotn. porézního anorganického substrátu, 2 % hmotn.
45 humínových látek, 1 % hmotn. oligo- nebo polysacharidů, 0,5 % hmotn. aminokyselin nebo oligopeptidů, 1 % hmotn. bílkovin, 0,5 % hmotn. hořčnatých nebo vápenatých hnojiv se přidá do kultivačního substrátu při výsevu semen 1 až 5 cm pod semena nebo do jamky při přesazování rostlin způsobem zabezpečujícím kontakt s kořeny rostlin.

50

Příklad 5

- Lokalita určená k zalesňování (odvaly nebo výsypky po důlní činnosti, emisní holiny apod.) se
55 oseje semeny pelušky obalenými kultivačním médiem s narostlou biomasou rhizosférických bakterií nakultivovaných dle příkladu 1 za přidavku melasy. Narostlá biomasa se použije k zelenému

hnojení a následný rok se na dané lokalitě vyseje jetel ošetřený shodným způsobem jako peluška. Na takto připravené lokalitě se provádí výsadba sazenic stromků inokulovaných mykorhizními houbami (připravenými dle příkladu 1) v lesní školce nebo běžnými sazenicemi stromků, jejichž kořeny se namočí do suspenze obsahující 60 % hmotn. napěstovaného mycelia ektomykorhizních hub, 5 % hmotn. drcené borky, 1 % solí humínových kyselin, 1 % hmotn. polysacharidů, 0,5 % hmotn. bílkovin, 0,1 % hmotn. hořečnatých nebo vápenatých hnojiv a 32,4 % hmotn. vody. Sazenice stromků s kořeny obalenými vytvořeným fixačním gelem se přímo použijí k výsadbě, nebo se zabalí do substrátu a obalí ochranným obalem pro přepravu a poté se sázejí.

10

Příklad 6

Lokalita určená k zalesňování se oseje semeny leguminózních rostlin obalenými kultivačním médiem s narostlou biomasou rhizosférických bakterií nakultivovaných dle příkladu 1 za přídavku hydrokoloidu z přírodních polysacharidů. Na takto připravené lokalitě se provádí výsadba sazenic stromků inokulovaných mykorhizními houbami (připravenými dle příkladu 1) v lesní školce nebo běžnými sazenicemi stromků, jejichž kořeny se namočí do suspenze obsahující 5 % hmotn. napěstovaného mycelia ektomykorhizních hub, 20 % hmotn. rašeliny, 20 % hmotn. humínových látek, 20 % hmotn. oligo- nebo polysacharidů, 5 % hmotn. bílkovin, 5 % hmotn. hořečnatých nebo vápenatých hnojiv a 25 % hmotn. vody. Sazenice stromků s kořeny obalenými vytvořeným fixačním gelem se přímo použijí k výsadbě, nebo se zabalí do substrátu a obalí ochranným obalem pro přepravu a poté se sázejí.

25 Průmyslová využitelnost

Způsob využití mikroorganismů a mykorhizních hub při remediačních a rekultivačních pracích je určen pro oblast zemědělství a lesnictví především na lokalitách s ekologickými zátěži s půdou kontaminovanou organickými polutanty ropného a koksochemického původu a na lokalitách po důlní činnosti (na odvalech a výsypkách charakteristických nedostatkem živin, humusu a podzemní vody) s příznivým dopadem na životní prostředí. Jeho využití slouží k dekontaminaci lokalit a k urychlenému zakořeňování vysazovaných rostlin a podpoře jejich růstu a vývoje především při zalesňování uvedených lokalit.

35

PATENTOVÉ NÁROKY

40

1. Způsob remediace a rekultivace ploch kontaminovaných organickými polutanty ropného nebo koksochemického původu nebo ploch po důlní činnosti v povrchových dolech nebo na odvalech po hlubinné těžbě nebo na holinách vytvořených v důsledku emisí či jiných ekologických zátěží, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se remediace provádí pomocí kultury mikroorganismu nebo směsné kultury mikroorganismů využívajících organické polutanty ropného nebo koksochemického původu a současná nebo následná rekultivace se provádí výsadbou stromků ve spojení s aplikací mykorhizních hub v kombinaci s podsevem leguminózními rostlinami inokulovanými rhizosférickými bakteriemi fixujícími na kořenech těchto rostlin atmosférický dusík.

50

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se biomasa mikroorganismů využívajících organické polutanty ropného nebo koksochemického původu, s výhodou rodu *Acinetobacter* a/nebo *Klebsiela* kultivuje 24 až 48 hodin v kultivačních baňkách nebo ve vzdušném fermentoru při 28 až 38 °C v základním živném médiu obsahujícím jako hlavní složku pepton a hovězí extrakt a poté se nakultivovaná biomasa aplikuje na plochu s kontaminovanou zemínou nebo se ve formě imobilizovaných mikrobiálních buněk v průtočném bioreaktoru využije k čiště-

55

ní kontaminované vody čerpané z vystrojených vrtů na lokalitě se zeminou kontaminovanou organickými látkami ropného nebo koksochemického původu a vyčištěná voda vytékající z průtočného bioreaktoru se nechá vsakovat do nadloží s kontaminovanou zeminou.

5 **3.** Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že mykorhizními houbami jsou ekto-
mykorhizní houby, s výhodou rodu *Boletus* a/nebo *Paxillus* a/nebo *Suillus* a/nebo *Laccaria*
a/nebo *Russula* a/nebo *Cortinarius* a/nebo *Lactarius* a/nebo *Entoloma* a/nebo *Hebeloma* a/nebo
10 *Lepista* a/nebo *Gymnopilus* a/nebo *Crucibulum* a/nebo *Agaricus* a/nebo *Hypholoma* a/nebo
Macrolepiota a/nebo *Morchella* a/nebo *Sparassis*, kultivované ve sladinném tekutém médiu
nebo v bramborovo sójovém bujónu při 15 až 25 °C a nakultivovaná biomasa ektomykorhizních
hub se použije jako přídatek k výsadbovému materiálu nebo se předem převede do suché formy
na sprayové sušárně nebo lyofilizací a následně se přidá k výsadbovému materiálu.

15 **4.** Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že mykorhizními houbami jsou
endomykorhizní houby, s výhodou rodu *Glomus* a/nebo *Gigaspora* a/nebo *Acaulospora* a/nebo
Sclerocystis, pěstované na hostitelské rostlině, např. na kukuřici, kultivované hydroponicky ve
směsi perlitu a písku v hmotnostním poměru 4 ku 1 až 1 ku 3 po přidavku spor nebo inokula
pěstovaných endomykorhizních hub a vytvořené mycelium ve formě substrátu s fragmenty koře-
nů hostitelské rostliny s hyfami a spory endomykorhizních hub se použije jako přídatek
20 k výsadbovému materiálu.

5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se buňky rhizosferní bakterie
rodu *Agrobacterium* a/nebo *Azotobacter*, kultivují v baňkách nebo ve vzdušném fermentoru při
28 až 38 °C v základním živném médiu a poté se nakultivovaná biomasa přímo použije jako pří-
25 datek k podsevu leguminózních rostlin nebo se převede do suché formy na sprayové sušárně
nebo lyofilizací a následně se přidá k podsevu leguminózních rostlin.

6. Způsob podle nároků 1, 3 až 5, **vyznačující se tím**, že se směs vytvořená z 5 až
90 % hmotn. napěstovaného mycelia ektomykorhizních hub nebo endomykorhizních hub a/nebo
30 5 až 25 % hmotn. rašeliny a/nebo 3 až 20 % hmotn. drcené borky a/nebo 2 až 15 % hmotn.
porézního anorganického substrátu a/nebo 2 až 20 % hmotn. humínových látek a/nebo 1 až 30 %
hmotn. oligo- nebo polysacharidů a/nebo 1 až 5 % hmotn. aminokyselin a/nebo oligopeptidů
a/nebo 0,5 až 10 % hmotn. bílkovin a/nebo 0,1 až 5 % hmotn. hořčnatých a/nebo vápenatých
hnojiv přidá do kultivačního substrátu při výsevu semen 1 až 5 cm pod semena nebo do jamky při
35 přesazování rostlin způsobem zabezpečujícím kontakt s kořeny rostlin.

7. Způsob podle nároků 1, 3 až 5, **vyznačující se tím**, že se směs vytvořená z 5 až
60 % hmotn. napěstovaného mycelia ektomykorhizních nebo endomykorhizních hub a/nebo 1 až
40 40 % hmotn. humínových látek a/nebo 1 až 20 % hmotn. oligo- nebo polysacharidů a/nebo 0,5
až 5 % hmotn. aminokyselin a/nebo oligopeptidů a/nebo 0,5 až 5 % hmotn. bílkovin a/nebo 0,1
až 5 % hmotn. hořčnatých a/nebo vápenatých hnojiv a/nebo 10 až 80 % hmotn. vody přidá ve
formě suspenze do kultivačního substrátu při výsevu semen nebo se přímo aplikuje do zeminy ke
kořenům pěstovaných rostlin.

45 **8.** Způsob podle nároků 1, 3 až 5, **vyznačující se tím**, že se kořeny sazenic rostlin
určených k výsadbě namočí v suspenzi obsahující 10 až 80 % hmotn. napěstovaného mycelia
ektomykorhizních nebo endomykorhizních hub a/nebo 5 až 25 % hmotn. rašeliny a/nebo 3 až
20 % hmotn. drcené borky a/nebo 2 až 15 % hmotn. porézního anorganického substrátu a/nebo 2
až 60 % hmotn. humínových látek a/nebo 1 až 30 % hmotn. oligo- nebo polysacharidů a/nebo
50 0,5 až 5 % hmotn. aminokyselin a/nebo oligopeptidů a/nebo 0,5 až 10 % hmotn. bílkovin a/nebo
0,1 až 5 % hmotn. hořčnatých a/nebo vápenatých hnojiv a/nebo 2 až 40 % hmotn. vody a
sazenice s kořeny obalenými vytvořeným fixačním gelem se přímo použijí k výsadbě nebo se
zabalí do substrátu a obalí ochranným obalem a poté se sázejí i s tímto ochranným a přepravním
obalem.

9. Způsob podle nároků 1, 3 až 8, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se na rekultivační ploše provede podsev leguminózními rostlinami s přidavkem biomasy s kultivačním médiem rhizosfer-
ních bakterií za přidavku fixačního gelu na bázi bílkovin nebo polysacharidů.

5

10

Konec dokumentu
