

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

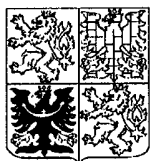
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1838-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15. 12. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.12.94,**
16.12.94, 16.12.94, 16.12.94

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/357686, 94/357700,**
94/357821, 94/357822

(33) Země priority: **US, US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 07. 98**
(Věstník č. 7/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/16364**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/18724**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 1/20
B 09 C 1/10
A 62 D 3/00

// (C 12 N 1/20, C 12 R 1:38,
C 12 R 1:15, C 12 R 1:01)

(71) Přihlášovatel:

CYTEC TECHNOLOGY CORP., Wilmington,
DE, US;

(72) Původce:

Pierce George E., Lebanon, NJ, US;
Smith Christopher V., Rissing Sun, MD, US;
English Carolyn W., Liberty Corner, NJ, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Systémy a způsoby biodegradace

(57) Anotace:

Vynález se týká aerobní reakce sloučenin, jako jsou aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, s mikroorganismy které jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy, které mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727. Výhodně se vynález týká aerobní degradace organických sloučenin ve fluidní nebo pevné fázi tak, že sloučeniny jsou biologicky čištěny na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

CZ 1838-97 A3

01-1022-97Če

Systémy a způsoby biodegradace

Oblast techniky

Vynález se týká aerobní degradace sloučenin, jako jsou aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny. Tyto sloučeniny jsou aerobně rozkládány novými mikroorganismy na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu za použití různých metod. Mikroorganismy jsou také schopny biologicky aerobně přečistit kompozice obsahující tyto sloučeniny. Navíc jsou mikroorganismy, které jsou zde popsány, schopny biologického aerobního odbourání nitro- a halogen-substituovaných aromatických sloučenin na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu bez produkce toxických meziproduktů nebo vedlejších produktů.

Tento vynález se dále týká systémů v kapalně fázi a metod aerobní reakce sloučenin, jako jsou aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny. Ve výhodných provedeních jsou elastomerní pevné látky nebo kaly obsahující takové sloučeniny jsou převedeny na fluidní kompozice vhodné pro aerobní reakci. V určitých provedeních fluidní kompozice zahrnují suspenze pro biologické čištění odpadních látek obsahujících organické sloučeniny nebo jejich směsi.

Tento vynález se dále týká systémů v pevné fázi a způsobů aerobní degradace sloučenin, jako jsou aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické,

alifatické a halogenalifatické sloučeniny v pevných látkách, kalech nebo půdách.

Tento vynález se navíc týká dvoukrokového způsobu biologického čištění odpadních látek obsahujících alespoň jednu sloučeninu vybranou ze silně halogenovaných organických sloučenin, například polychlorovaných bifenylů, polybromovaných bifenylů atd., silně nitrovaných sloučenin, jako je trinitrotoluen atd., a silně nitrovaných a zesíťovaných polymerních sloučenin, například nitrocelulózy atd. Podle tohoto provedení je odpadní látka nejprve smíšena s reakčním činidlem schopným alespoň částečně degradovat uvedené sloučeniny v odpadním materiálu a poté uvedena do kontaktu s novými mikroorganismy, které aerobně odbourají jakoukoli aromatickou, substituovanou aromatickou nebo alifatickou sloučeninu přítomnou ve zpracovávaném odpadním materiálu.

Tento vynález se dále týká systémů pro biologické čištění plynů, aerosolů a tekutin obsahujících kapaliny za použití novým mikroorganismů imobilizovaných na pevném nosiči.

Dosavadní stav techniky

Použití mikroorganismů ke zpracování odpadů nebo odpady obsahujících materiálů je dobře doložené. V únoru 1990 na sympóziu, které předcházelo akci "EPA - Industry Meeting on Environmental Applications of Biotechnology", EPA konstatovala, že biotechnologie byly úspěšně použity pro zpracování půd a kalů z různých míst, které obsahovaly kontaminanty z mnoha a různých zdrojů. Ekonomické a ekologické zřetele naznačují, že biologické technologie zpracování nabízejí značný potenciál pro čištění a

zpracování odpadů a odpady obsahujících materiálů. Použití technologií odstraňování odpadů, jako je spalování nebo chemická fixace a zapouzdřování, má za následek kromě nákladů spojených s manipulací a přepravou těchto materiálů na místo zpracování, také vysoké kapitálové náklady. Metody biologického odbourávání vyžadují nižší náklady v porovnání s jinými metodami, protože se provádí na místě a používají méně složité zařízení. Navíc mohou být prováděny kombinací nadzemního a in situ zpracování při komplexním přístupu ke zpracování.

Příklady mikrobiálního rozkladu nebo zpracování sloučenin jsou dobře známy ze stavu techniky. Například patenty Spojených států amerických číslo 4 843 007 a 4 876 201 popisují aerobní zpracování polychlorovaných bifenylů (PCB) a acetofenonů pomocí rodu *Alcaligenes*, avšak není popsáno štěpení aromatických kruhů, což naznačuje, že sloučeniny nebyly degradovány na úroveň mineralizace. Navíc patentové spisy US 5 009 999 a 4 876 201 popisují podobně aerobní zpracování PCB pomocí rodu *Pseudomonas*, také bez dokladů o štěpení kruhu. Pat. spis US 4 493 895 popisuje aerobní zpracování halogenovaných organických sloučenin pomocí *Pseudomonas cepacia*, přičemž pat. spis US 5 100 800 popisuje zpracování stejných sloučenin pomocí *Pseudomonas putida*, kmene UNK-1.

U halogenalifatických sloučenin, jako je trichlorethylen nebo dimethylamoniumchlorid, byla již také popsána aerobní degradace. Konkrétní příklady se nachází v pat. spisech US 4 713 343 (trichlorethylen), 4 492 756 (dimethylamoniumchlorid) a 5 079 166 (trichlorethylen).

Funk a kol. v Appl. Environ. Microbiol. 59:7, str. 2171-2177 (1993) popisuje dvoukrokový in situ způsob

zpracování půd kontaminovaných 2,4,6-trinitrotoluenem, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazinem a oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazocinem. Půda je nejprve za účelem podpoření bakteriální aktivity zaplavena vodným pufrem a škrobem. Aerobní heterotrofní organismy v půdě nebo přidané jako inokulum rychle odstraní z půdy kyslík, čímž se vytvoří anaerobní podmínky. Za anaerobních podmínek jsou kontaminující sloučeniny částečně degradovány mikroorganismy. Nebyly však degradovány na oxid uhličitý a vodu, protože byly redukovány pouze substituované nitroskupiny a aromatický kruh nebyl štěpen.

Venkataramani a Ahlert v J. WPCF, 56:11, str. 1178 - 1184 (1984) popisují použití přizpůsobených bakterií z čistíren odpadních vod k aerobní degradaci kontaminantů u výluhu z průmyslových závazek.

Převážná část publikované literatury týkající se biologického odbourávání je zaměřena na odbourávání jednoduchých čistých chemikálií čistými kulturami a ne odbourávání komplexních směsí organických kontaminantů směsnými kulturami nebo mikrobiálními společenstvími. Mnoho prací pojednávajících o čistých chemikáliích bylo také provedeno v koncentracích, které jsou řádově nižší, než koncentrace, které jsou běžně dosahovány u průmyslových odpadů. Například Speitel a kol. (Environ. Sci. Technol. 23: 68 - 74, 1989) zkoumal odbourávání fenolů (například p-nitrofenolu, 2,4-dinitrofenolu a pentachlorfenolu) za použití čistých chemikálií při velmi nízkých koncentracích, to je 1 až 100 ppb. Podobně Arcangeli a Arvin, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 510 - 517, použili ve svém bioreaktoru velmi nízké koncentrace toluenu, to je 1 ppm až 6 ppm.

V řízených studiích mikrokosmu ukázal Heitkamp a kol. (1987, Appl. Environ. Microbiol. 53: 129 - 136), že naftalen, pokud je přidán do vybraného mikrokosmu půdy na úrovních koncentrace menších než 1 ppm, může být účinně mineralizován během 17 až 31 dnů.

Má se obecně za to, že odbourávání aromatických látek substituovaných methylovými skupinami v přírodě se děje cestou meta-štěpení. Avšak odbourávání halogenovaných organických látek, jako je například chlorbenzoát, probíhá nejlépe cestou ortho-štěpení. Knockmuss, (Taeger a kol., 1988, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 603 - 608; Romanov a kol. 1993, Microbiology 62: 887 - 896) a Pierce (Pierce a kol. 1983, Dev. Ind. Microbiol. 24: 499 - 507; Pierce a kol., 1984, Dev. Ind. Microbiol. 25: 597 - 602), ukázali, že lze získat mikroorganismy, které jsou schopny odbourávat jak methyl-, tak chlor- aromatické látky prostřednictvím ortho-cesty. Podobně Oltmanns a kol., 1988, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 609 - 616) ukázal, že lze zkonstruovat bakterie přírodního původu, které jsou schopné odbourávat 1,4-dichlorbenzen modifikovanou ortho-cestou, která se nevyskytuje u kmenů divokého typu.

Boronin a spolupracovníci (Boronin a kol., 1993, FEMS Microbiol. Letters. 113: 303 - 308) ukázali při přípravě různých naftalenových plazmidových konstruktů v *P. putida*, že pokud je naftalen jediný zdroj uhlíku a energie, nejvyšší specifická rychlost růstu je pozorována s metha-cestou > ortho-cestou > gentisátovou cestou.

Rozklad směsných organických substrátů a zvláště směsí substituovaných aromatických látek zvyšuje významně biochemickou komplexnost degradace a regulovatelnost a fyziologickou kontrolu těchto degradativních procesů.

Klíčovým faktorem při degradaci směsných organických substrátů, zvláště tam, kde jsou cesty indukovatelné, je to, jak jsou kultury na počátku kultivovány (a tak indukovány).

Hollander a kol. 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 2330 - 2338) pozoroval, že *Comamonas testosteroni* (dříve klasifikovaná jako *Pseudomonas testosteroni*) rozkládá 4-chlorfenol a 4-methylfenol postupně a ne současně (simultánně). Tato degradace probíhá metha-cestou.

Avšak tam, kde bylo dodáváno více organických sloučenin, které byly degradovány pouze metha-cestou, degradace byla simultánní. Díky počáteční indukci metha-cesty, degradace sloučenin, která probíhá ortho-cestou, požaduje další dobu zpracování, protože se musí indukovat vhodné enzymy k dosažení odpovídající úrovně degradace těchto sloučenin. V těchto případech tento požadavek na prodloužení doby zpracování má přímý negativní vliv na ekonomiku zpracování.

V poslední době Grifoll a kol., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 2438 - 2449) izoloval *Pseudomonas* sp. (kmen F274), který je schopen metabolizovat fluoren a když je kultivován v přítomnosti p-hydroxybenzoátu, štěpí p-hydroxybenzoát ortho-cestou. Tento kmen není však schopen využít toluen, naftalen nebo benzen.

Stejná situace byla pozorována (Pettigrew a kol., 1991, Appl. Environ. Microbiol. 57: 157 - 162) u degradace chlorbenzenu a toluenu pomocí kmene *Pseudomonas*, kde, dokud nebyla metha-cesta potlačena/modifikována, nebyla možná simultánní degradace organických látek metabolizovaných metha-cestou a ortho-cestou.

Viliesid a Lilly, 1992, *Enz. Microb. Technol.* 14: 561 - 565 ukázali, že bazální nebo indukované koncentrace katechol-1,2-dioxygenázy (klíčového enzymu ortho-cesty) jsou přímo ovlivňovány tlakem rozpuštěného kyslíku. Podle jejich pozorování bylo k udržení aktivní degradace ortho-cestou nezbytné, aby tlak kyslíku byl nad 4 % saturace (při iniciaci degradace).

V pozdější literatuře jsou uvedeny případy, kde vyšší koncentrace (1000 ppm) fenolu (Brown a kol., 1993, *Critical Review and Case Study on Biotechnology for Pollution Prevention*, United States EPA; Hinteragger a kol., 1992) nebo xylenu (Wolfram a kol., 1990, NTIS Report č. EGG-m-90407, str. 17) ve vodných roztocích byly úspěšně rozkládány.

Je však třeba věnovat pozornost rozlišení mezi primárním metabolismem a kometabolismem nebo „resting cell metabolism“ (zbytkovým buněčným metabolismem). Viz například Spain a Gibson (1988, *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1399 - 1404), kteří uvádějí zbytkový buněčný metabolismus nitrofenolů u buněk kultivovaných s toluenem; a Taylor a Amador, (1988, *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2342 - 2344), kteří ukazují zbytkový buněčný metabolismus pyridinu u buněk kultivovaných s ftalátem.

Podle definice heterotrofní bakterie využívají různé formy organického uhlíku jako zdroje uhlíku a energie. Kromě zdrojů uhlíku, vyžadují heterotrofní bakterie k růstu také dusík a fosfor. Ke splnění těchto požadavků se nejběžněji dodávají anorganické formy dusíku nebo fosforu, ačkoli použití organického dusíku ve formě aminokyselin (aminového dusíku) bylo dříve také používáno. Naproti tomu literatura dokumentuje splnění požadavků na dusík

použitím uhlovodíků, které obsahují dusík, například heterocyklů nebo nitrofenolu nebo použití organických sloučenin fosforu, například fosfornanů, jako méně používané (Wackett a kol., 1987, J. Bacteriol 169: 710 - 717; Schowanek a Verstraete, 1990, Appl. Environ. Microbiol. 56: 895 - 903. Degradace glyfosatu v přírodě je prováděna bakteriemi, které využívají nejen organický uhlík tohoto pesticidu pro růst a energii, ale také využívají organický fosfor glyfosatu jako zdroj fosforu. Degradace glyfosatu v přírodě je ve skutečnosti potlačována, pokud jsou přítomny vhodnější formy anorganického fosforu.

I když existuje značný zájem na použití kometabolické aktivity k degradaci určitých organických odpadů, jako je TCE, použití kometabolických procesů ke zpracování směsných odpadů je poněkud neúčinné, a tak v konečném důsledku více nákladné. Klecka a Maier, 1988, Biotechnol. Bioeng. 31: 328 - 335, ukázali, že pokud jsou degradovatelné ale neutilizovatelné zdroje uhlíku přidány ke směsné populaci bakterií degradujících pentachlorfenol, rychlost degradace pentachlorfenolu se snižuje. Když jsou však přidány utilizovatelné formy uhlovodíku do směsi, celková rychlost čištění roste. Tento růst probíhá díky nárůstu biomasy, která má za následek celkové zlepšení degradace.

Aerobní degradace vybraných aromatických látek a polyaromatických uhlovodíků (PAHS) je dobře zdokumentována. Avšak podle znalostí původců tohoto vynálezu, aerobní degradace sloučenin přítomných v elastomerních nebo dehtovitých kompozicích dosud nebyla popsána. Za podmínek anaerobní respirace (to znamená redukce dusičnanů/denitrifikace) oxidativní degradace těchto vybraných chemikálií byla popsána za použití dusičnanů jako

terminálních akceptorů elektronů (Bossert a Young, 1986, Appl. Environ. Microbiol. 52: 1117 - 1122; Bouwer a Mc Carty, 1983, Appl. Environ. Microbiol., 45: 1295 - 1299. Avšak degradace sloučenin, jako je naftalen, není za nitrátové respirace rychlá. Mihelcic a Luthy, 1988, Appl. Environ. Microbiol. 54: 1188 - 1198 dokázali, že je potřeba k degradaci naftalenu při koncentraci 1 ppm za denitrifikačních podmínek přibližně 63 dní.

Fries a kol. 1994, Appl. Environ. Microbiol., 60: 2802 - 2810, obecně udávají, že biologická degradace benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenu za aerobních podmínek je dobře známá, ačkoliv dostupnost kyslíku se díky své nízké rozpustnosti ve vodě a díky malé rychlosti transportu v půdách a usazeninách často stává prvkem limitujícím rychlost. Fries popisuje anaerobní respiraci toluenu mikroorganismy izolovanými z přírody za použití $\leq 0,5$ ppm toluenu. Mikroorganismy mohou růst na 25 ppm toluenu a mohou být zásobovány 50 ppm toluenu. Nebyly uvedeny žádné důkazy, že tyto mikroorganismy mohou degradovat jakékoli vyšší koncentrace toluenu.

Ortega-Calvo a Alexander, 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 2643 - 2646, uvažovali, že dvě fyziologicky rozdílné populace, jedna volně plavající a druhá na organické mezivrstvě, jsou zapojeny do degradace sloučenin, jako je naftalen (pokud je dodáván v koncentracích 0,1 až 1,0 ppm). Podle jejich pozorování se zdá, že počáteční aktivita je vyvíjena volně plavajícími bakteriemi, které jsou závislé na rozdělení naftalenu do vodné fáze.

V poslední době, Hack a kol, 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 495 - 499, ukázal, že buňky *P. putida*, když

rostou na glukóze, ztrácejí přes 50 % této aktivity během 90 hodin při skladování při 4 °C.

Zvláštní důraz byl v poslední době kladen na kometabolismus trichlorethylenu, TCE, rekombinantním kmenem *P. cepacia* G4 při růstu na toluenu. V Landa a kol., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 3368 - 3374, byly vyvozeny následující závěry. Je třeba podstatných množství toluenu k degradaci malého množství TCE. Přibližně 64 ppm toluenu je třeba k tomu, aby se zmetabolizovalo 3,2 ppm TCE (v poměru 20 dílů degradovaného toluenu na každý díl degradovaného TCE). Navíc, pokud koncentrace TCE překročí 19 ppm, kompetitivní inhibice degradace toluenu má za následek ztrátu kometabolismu TCE a zastavení degradace toluenu.

Bakteriální procesy s imobilizovanými a zachycenými buňkami jsou známy mnoho let (Atkinson a Movituna, 1991, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*: 2. vydání, Stockton Press, NY). Tyto způsoby si kladou za úkol poskytnout další užitek ve vztahu k zlepšení energičnosti mikroorganismů. Například Dickman a kol. 1990, *Bioprocess Eng'r* 5: 13 - 17, ukázal zlepšení stability vůči úbytku kyslíku a pH šoku u imobilizovaného kontinuálního kultivačního reaktoru oproti volně plovoucím bakteriím. Westmeier a Rehm, 1985, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 301 - 305 ukázali, že imobilizované buňky *Alcaligenes* sp. rozkládají 4-chlorfenol rychleji, než volně plovoucí buňky, pokud je dodáván 4-chlorfenol v nízkých koncentracích (to je méně nebo rovno 19 ppm).

Haigler a kol., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 3466 - 3469, popisuje izolaci kmene *Pseudomonas* (kmen JS42) založenou na jeho schopnosti rozkládat a utlizovat

2-nitrotoluen (2-NT) jako jediný zdroj uhlíku, energie a dusíku. I když odkazy ukazují, že tento kmen byl schopen využívat 2-nitrotoluen, Haigler konkrétně udává, že *Pseudomonas* kmen JS42 není schopen využít nitrobenzen. Navíc Haigler neuvádí žádnou zmínku, která by se týkala schopnosti degradovat nebo využívat anilin nebo naftalen. I když opláchnuté buňky kmene JS42 kultivované na 2-NT jsou schopny oxidovat nitrobenzen, odkazy specificky osvětlují, že tyto buňky nemohou využívat nitrobenzen. Proto je tato biotransformační aktivita správněji definována jako kometabolismus.

Kompostování nebezpečných organických odpadů představuje relativně nové použití technologie biologického zpracování. Nejpozoruhodnější je příklad kompostování chlorfenolů (Valo a Salkinoja-Salonen, 1986, Appl. Environ. Microbiol. 25: 68 - 75). Avšak doba potřebná ke zpracování kontaminovaných půd za použití této technologie není krátká (> 4 měsíce). Součástí problému použití kompostování chlorfenolů je rozvoj dostatečné koncentrace aktivních degraderů chlorfenolu. I když byl tento problém částečně řešen Valem a Salkinoja-Salonenem (1986) pomocí přidavku jiných mikrobiálních prostředků, bylo to možné pouze tehdy, když byla půda před tím sterilována za účelem zničení původní mikroflory.

Anglický patent č. 1375394 uvádí obecně, že mikroorganismy rodů *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium* nebo *Sarcina* mohou aerobně degradovat nitroaromatické sloučeniny. Tyto odkazy udávají, že u těchto mikroorganismů musí být vyvolána (indukována) schopnost takové degradativní aktivity. Avšak nejsou žádné údaje o tom, jaká koncentrace nitroaromatických sloučenin

by měla být použita pro indukci, ani žádné údaje o tom, jaké podmínky kultivace by měly být použity. Dále zde nejsou žádné údaje o tom, které konkrétní druhy ze zmiňovaných rodů by mohly být indukovány, aby měly požadovanou degradativní aktivitu, ani není žádná zmínka o tom, kde mohou být tyto mikroorganismy nalezeny.

Evropská patentová publikace číslo 0278296 obecně popisuje způsob současného chemického a biologického zpracování pevných látek a kapalin obsahujících organické znečištění.

Zůstává tudíž reálná potřeba mikroorganismů a systému a způsobů, které jsou vhodné pro rychlou a účinnou aerobní degradaci (rozklad) aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických a halogenalifatických sloučenin. Existuje také skutečná potřeba degradace některé nebo všech těchto sloučenin, pokud jsou přítomny v elastomerních nebo dehtovitých materiálech.

Citace nebo identifikace jakéhokoli odkazu v kapitole 2 této přihlášky by neměla být považována za důkaz, že tento odkaz je přístupný jako dosavadní stav techniky pro tuto přihlášku vynálezu.

3. Podstata vynálezu

Jsou předloženy nové izolované mikroorganismy, v čisté nebo směsné kultuře, které jsou vhodné pro aerobní degradaci aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických a halogenalifatických sloučenin nebo jejich směsí. Mikroorganismy jsou výhodně vhodné pro aerobní degradaci

01.04.98

vedených sloučenin, pokud jsou obsaženy v elastomerních a/nebo dehtovitých pevných látkách, kalech nebo půdách, stejně jako když jsou obsaženy v neelastomerních kompozicích. Mikroorganismy jsou také vhodné pro degradaci těchto sloučenin nebo jejich směsí ve formě plynů, aerosolů nebo tekutin, včetně kapalin. Jsou poskytnuty také biofiltry obsahující mikroorganismy.

Mikroorganismy mohou být uskladněny po dlouhou dobu, například alespoň 4 měsíce, bez ztráty degradativních aktivit. Navíc mohou mikroorganismy rychle a účinně degradovat relativně vysoké koncentrace uvedených sloučenin nebo jejich směsí. Dále mohou mikroorganismy tolerovat široké rozmezí koncentrací uvedených sloučenin. Mikroorganismy jsou schopné využít alespoň jednu z těchto sloučenin jako jediný zdroj uhlíku a energie. Některé mikroorganismy jsou schopné využít alespoň jednu ze sloučenin jako jediný zdroj uhlíku a dusíku.

Jsou předkládány nové způsoby výhodné pro aerobní reakce sloučenin ve fluidní fázi a pevných systémech.

Ve zvláště výhodném provedení jsou předkládány systémy ve fluidní fázi, nové způsoby pro rychlou a účinnou degradaci alespoň jedné sloučeniny vybrané z aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických nebo halogenalifatických sloučenin nebo jejich směsí obsažených v elastomerních a/nebo dehtovitých pevných látkách, kalech nebo půdách.

Ve zvláště výhodném provedení jsou předkládány systémy v pevné fázi, nové způsoby pro rychlou a účinnou degradaci alespoň jedné sloučeniny vybrané z aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických,

halogennitroaromatických, alifatických nebo halogenalifatických sloučenin nebo jejich směsí obsažených v elastomerních a/nebo dehtovitých pevných látkách, kalech nebo půdách.

Systémy fluidní a pevné fáze mohou být vybrány k účinné manipulaci s širokou škálou vstupních živin v časovém období značně kratším, než konvenční způsoby využívané pro biodegradaci aromatických a/nebo alifatických sloučenin.

Podle jednoho z provedení tohoto vynálezu je předkládán způsob aerobní degradace aromatických a/nebo substituovaných aromatických sloučenin. Metoda obecně spočívá v uvedení aromatické sloučeniny do kontaktu se směsnou nebo čistou kulturou mikroorganismů, přičemž uvedené mikroorganismy jsou vybrány ze skupiny, skládající se z mikroorganismů, které mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. V jednom z provedení tohoto způsobu je aerobně degradována alespoň jedna sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické nebo halogenalifatické sloučeniny. V jiném provedení tohoto způsobu je aerobně degradována směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny. Způsob může dále zahrnovat kultivaci mikroorganismů v kontaktu s uvedenou sloučeninou/sloučeninami, tak, že aromatická sloučenina nebo sloučeniny jsou degradovány na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Podle jiného provedení vynálezu jsou předkládány systémy ve fluidní fázi a způsoby pro aerobní reakci sloučenin. Systémy ve fluidní fázi obecně představují konverzi elastomerní pevné látky nebo kalu na fluidní kompozice vhodné pro aerobní reakci organických sloučenin obsažených v elastomerní pevné látce nebo kalu. Aerobní reakce, pro které jsou vhodné fluidní kompozice, zahrnují syntetické stejně jako degradativní reakce, které probíhají výhodně za aerobních podmínek.

Způsob přípravy fluidní kompozice vhodné pro aerobní reakci zahrnuje kroky: a) partikularizace elastomerní pevné látky nebo kalu, které obsahují organickou sloučeninu; a b) kontakt partikularizované pevné látky nebo kalu v nádobě s proudem tekutiny vybrané ze skupiny zahrnující kyslík, plyn obsahující kyslík, včetně vzduchu, vodu a vodný roztok, tak, že partikularizovaná pevná látka nebo kal je suspendován nebo dispergován v proudu tekutiny k vytvoření kompozice vhodné pro aerobní reakci organické sloučeniny obsahující pevnou látku nebo kal.

Způsob může dále zahrnovat smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování buď současně nebo následně po kroku a).

Podle jiného provedení tohoto vynálezu jsou předkládány systémy ve fluidní fázi a způsoby aerobní degradace sloučenin za použití mikroorganismů. Je vytvářena fluidní fáze, která je suspenzí vytvořenou například z pevné látky, půdy a/nebo kalu.

Fluidní fáze, která je suspenzí, může být vytvořena buď z neelastomerní nebo z elastomerní pevné látky, kalu nebo půdy. Takovéto suspenze jsou používány k aerobní degradaci aromatických nebo alifatických sloučenin nebo

jejich směsí obsažených v uvedené pevné látce, kalu nebo půdě.

Způsob zahrnuje a) smíchání uvedené pevné látky nebo kalu s vodou nebo s vodným roztokem; a b) zavádění energie do uvedené kombinace pevná látka nebo kal/voda v nádobě tak, že pevná látka nebo kal je fluidizován za vzniku suspenze.

Energie může být zavedena například zaváděním mechanické energie, například pomocí míchání; zaváděním akustické energie, například zaváděním stálých akustických vln, do suspenzních materiálů; nebo zaváděním elektrického nebo elektrostatického pole.

V jednom alternativním provedení způsob zahrnuje a) smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem; b) zavedení energie do uvedené kombinace elastomerní pevná látka nebo kal/voda tak, že uvedená pevná látka nebo kal je fluidizován za vzniku suspenze; a c) odseparování uvedené suspenze od jakékoli reziduální elastomerní pevné látky nebo kalu.

Alternativně metoda zahrnuje a) smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování za vzniku kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování; b) smísení uvedené pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem za vzniku vodné kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování; a c) dodávání energie do uvedené vodné kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování tak, že uvedená nelepivá pevná látka nebo kal je fluidizován za vzniku suspenze. Tento způsob může dále obsahovat směšování uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování za vzniku nelepivé pevné látky nebo kalu. V ještě další alternativě způsob zahrnuje a)

smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování a vodou nebo vodným roztokem; a b) zavádění energie do uvedené směsi vytvořené v kroku a) tak, že uvedená elastomerní pevná látka nebo kal je fluidizován za vzniku suspenze.

Podle tohoto vynálezu způsob biologického čištění pevných látek, kalů nebo půd obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny v suspenzní fázi zahrnuje a) úpravu pH suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a b) kontaktování uvedené neutrální suspenze s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou suspenzí tak, že sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Způsoby biologického čištění pevných látek, kalů nebo půd obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny v pevné fázi zahrnují a) směšování uvedené pevné látky, kalu nebo půdy s objemovým činidlem tak, že tekutina, například vzduch, může snadno procházet nabytou směsí; b) úpravu pH nabyté směsi k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a c) kontaktování uvedené nabyté směsi s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující

mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou nabytou pevnou látkou, kalem nebo půdou tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Když je pevná látka, kal nebo půda dehtovitou nebo elastomerní pevnou látkou, kalem nebo půdou, způsob biologického čištění v pevné fázi zahrnuje: a) směšování dehtovité nebo elastomerní pevné látky, dehtovitého nebo elastomerního kalu nebo dehtovité nebo elastomerní půdy s činidlem proti slepování tak, že uvedená pevná látka, půda nebo kal tvoří partikularizovanou méně dehtovitou a/nebo elastomerní směs.

Jiné provedení tohoto vynálezu představuje biofiltr a způsoby jeho použití. Biofiltry jsou používány v biologickém čištění sloučenin v proudech, jako je vzduch, páry, aerosoly a voda nebo vodné roztoky.

Podle ještě dalšího provedení vynálezu je předkládána dvoukroková metoda aerobní degradace odpadních materiálů obsahujících alespoň jednu sloučeninu, vybranou ze silně halogenovaných organických sloučenin, jako jsou polychlorované bifenyly, polybromované bifenyly atd., a ze silně nitratovaných sloučenin, jako je trinitrotoluen atd., a silně nitrovaných a zesíťovaných polymerních sloučenin, například nitrocelulóz atd. Odpadní materiály mohou dále zahrnovat sloučeninu vybranou ze skupiny tvořené aromatickými, nitroaromatickými, halogenaromatickými, halogennitroaromatickými, alifatickými a halogenalifatickými sloučeninami nebo směsí těchto

sloučenin. Způsoby zahrnují: a) smíchání reagentu schopného chemicky degradovat, alespoň částečně, silně halogenovanou, silně nitrovanou nebo silně nitrovanou zesíťovanou sloučeninu v odpadním materiálu za vzniku předzpracované kompozice; a b) kontaktování uvedené předzpracované kompozice s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členy skupiny zahrnující mikroorganismy, které mají deponitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů tak, že alespoň jedna sloučenina je degradovaná na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Rychlosti a účinnosti, kterých se dosahuje pomocí způsobu podle tohoto vynálezu, nebylo nikdy před tím dosaženo u biologického čištění dehtovitých nebo elastomerních kompozic obsahujících buď směs aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických a halogenalifatických sloučenin nebo tyto sloučeniny samotné.

Tento vynález může být blíže popsán pomocí následujících definic, detailního popisu vynálezu, ilustrativních příkladů konkrétních provedení vynálezu a připojených obrázků ve kterých:

4. Stručný popis obrázků na výkresech

Obrázek 1a-c. Schematický nákres typického příkladu systému ve fluidní fázi. Obrázek 1a ilustruje systém tvorby suspenze; obrázek 1b ilustruje systém biologického čištění ve fluidní fázi; a obrázek 1c ilustruje filtraci a odvodnění zpracovávaných materiálů.

Obrázek 2. Schematický diagram tvorby suspenzní fáze.

Obrázek 2a. Tvorba suspenzní fáze z neelastomerní pevné látky, kalu nebo půdy. Obrázek 2b. Tvorba suspenzní fáze z elastomerní pevné látky, kalu nebo půdy.

Obrázek 3. Graf dokumentující korelaci mezi snižujícími se koncentracemi uhlovodíkových sloučenin a vzrůstající koncentrací vytvořeného oxidu uhličitého. □ naftalen; ● toluen; ○ benzen; ∇ oxid uhličitý.

Obrázek 4. Graf dokumentující degradaci naftalenu během 30 dnů v sekvenčním vsádkovém bioreaktoru.

■ naftalen.

Obrázek 5. Graf dokumentující degradaci naftalenu a benzenu během 30 dnů v sekvenčním vsádkovém bioreaktoru.

■ naftalen; ◆ benzen.

5. Definice

Při použití u tohoto vynálezu, následující termíny mají zahrnovat:

Aerobní - Týkající se kyslíku nebo vyžadující kyslík, kde tlak kyslíku je 0,1 % až 100 % saturace (kde 100% saturace odpovídá 40 mg O₂ na litr vztaženo na kyslík ve vodě při 25 °C), výhodně mezi 4 % až 80 %, zvláště výhodně mezi 10 % a 20 %.

Alkyl - Methylová, ethylová nebo propylová skupina.

Alifatický - Acyklická nebo alicyklická organická uhlovodíková sloučenina, která může být považována za derivát methanu a nemá cyklický konjugovaný šestičlenný uhlíkový (benzenový) kruh.

Aromatický - Organická sloučenina, která se vyznačuje přítomností alespoň jednoho cyklického šestičlenného zcela konjugovaného uhlíkového kruhu (benzen), nebo jednoho cyklického zcela konjugovaného pěti- nebo šestičlenného heterokruhu, ve kterém je jeden nebo více uhlíků v kruhu nahrazeno dusíkovým atomem / atomy. Pojem je zvolen tak, aby zahrnoval nesubstituované aromatické sloučeniny stejně jako aromatické sloučeniny obsahující jednu nebo více následujících skupin na místě atomu / atomů vodíku a to: hydroxylovou, aminovou, alkylovou, karboxylovou nebo nesubstituovanou nebo substituovanou alifatickou skupinu, ve které substituovaná alifatická skupina obsahuje karbonylovou nebo karboxylovou skupinu na místě atomu / atomů vodíku.

Objemové činidlo - Sloučenina nebo kompozice, která, pokud je přidána k pevné látce, kalu nebo půdě, usnadňuje tok tekutiny takovouto pevnou látkou, kalem nebo půdou.

Podobný kompostování - Způsob, při kterém organické uhlovodíkové sloučeniny v pevné kompozici jsou degradovány mikroorganismy, obvykle v uzavřeném nebo ohraničeném prostoru.

Činidlo proti slepování - Sloučenina, která, pokud je smíšena s elastomerní nebo dehtovitou látkou, poskytuje méně elastomerní nebo méně dehtovitou látku. Pokud se jí použije ve spojení se způsobem pro tvoření suspenze, činidlo proti slepování - napomáhá kompozici stát se fluidizovatelnou.

Elastomerní - Vlastnost, díky které pevná látka mění svůj tvar a velikost za působení protichůdných sil, ale nabývá své původní konfigurace, pokud tyto síly zmizí, za

předpokladu, že protichůdné síly nepřesáhnou modul elasticity pevného materiálu.

Halogenalifatický - Alifatická uhlovodíková sloučenina obsahující jeden nebo více atomů halogenu, jako jsou například chlor, brom nebo jod nebo jejich směsi, na místě atomu / atomů vodíku.

Halogenaromatický - Aromatická uhlovodíková sloučenina obsahující jeden nebo více atomů halogenu, jako například chlor, brom, jod nebo jejich směsi, na místě atomu / atomů vodíku.

Halogennitroaromatický - Aromatická uhlovodíková sloučenina obsahující jeden nebo více atomů halogenu, jako například chlor, brom, jod nebo jejich směs, na místě atomu / atomů vodíku a obsahující jednu nebo více nitroskupin na místě atomu / atomů vodíku.

Fluidace - Proces, při kterém je přiváděna energie, jako například mechanická energie, aby suspendovala jemně rozdělené nebo partikularizované pevné látky v tekutině, jako je například vzduch, voda nebo vodný roztok.

Nitroaromatický - Aromatická uhlovodíková sloučenina obsahující jednu nebo více nitroskupin na místě atomu / atomů vodíku.

Kal („sludge“) - Soubor pevných látek, jako například, usazenina na dně, které se usadily ze suspenze.

Suspenze („slurry“) - Suspenze jemně rozdělených nebo partikularizovaných pevných látek v tekutině nebo kapalině, do které se může zavádět energie, jako například mechanická energie, k udržení disperze partikularizovaných pevných látek.

Dehtovitý - Viskózní látka obsahující uhlovodík, která může mít konzistenci a vzhled střešního dehtu.

TCL - „Target Compound List“ (seznam cílových sloučenin), stanovený seznam sloučenin analyzovaných za použití extrakce rozpouštědlem, jak je definováno v EPA, SW-846. Zde užito extrakce, kde extrakčním rozpouštědlem je methylenchlorid : methanol (90 : 10).

TCLP - „Toxicity Characteristic Leaching Procedure“, metoda vodné extrakce, jak byla definována v EPA, SW-846, metoda číslo 1311.

6. Detailní popis vynálezu

6.1. Nové izolované mikroorganismy

Nové mikroorganismy byly izolovány z půdy a vybrány na základě schopnosti využít specifické sloučeniny, jako aromatické, substituované aromatické a/nebo alifatické sloučeniny jako jediné zdroje dusíku a/nebo uhlíku a zdroje energie. Mikroorganismy jsou vhodné pro aerobní degradaci alespoň jedné z těchto sloučenin. Způsob selekce zajišťuje, že biochemická aktivita mikroorganismů je zaměřena na odbourání alespoň jedné z těchto sloučenin a že mikroorganismy jsou schopné využívat alespoň jedné ze sloučenin jako výhradního zdroje živin. Přestože původci tohoto vynálezu si nepřejí, aby byli omezeni na konkrétní mechanismus působení, má se za to, že takové využití vede k mineralizaci sloučeniny/sloučenin primárním metabolismem a ne kometabolismem. Důležitým prvkem v selekci požadovaných mikroorganismů je to, že selekční proces je prováděn za aerobních podmínek tak, že izolované mikroorganismy aerobně rozkládají požadovanou sloučeninu

nebo její směs. Navíc mikroorganismy mohou rozkládat směsi současně, nikoli postupně.

Navíc, přestože původci tohoto vynálezu nemají v úmyslu omezovat vynález na zvláštní mechanismus působení, má se za to, že většinou dochází k rozkladu cestou ortho- nebo modifikovanou ortho cestou. Ortho- nebo modifikovaná ortho- cesta je zvláště důležitá, aby nebyly produkovány vysoce toxické halogenkyseliny a/nebo nemetabolizovatelné meziprodukty jako meziprodukty nebo konečné produkty během degradace halogenaromatických sloučenin nebo aromatických sloučenin substituovaných jednou nebo více methylovými skupinami. Je třeba poznamenat, že například dva z popsaných mikroorganismů, to znamená DAP 66 a DAP 70, mají katechol-2,3-dioxygenázovou aktivitu, která naznačuje schopnost meta-štěpení.

Dále jsou mikroorganismy izolovány tak, že jsou schopny přežít vysoké a/nebo měnící se koncentrace sloučenin.

Navíc mikroorganismy mohou degradovat vysokou koncentraci jednotlivých sloučenin nebo směsi organických sloučenin, například, $\geq 1 \%$ (10 000 ppm). Při použití v tomto vynálezu, je termín „vysoké“ koncentrace aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických a halogenalifatických sloučenin použit tak, aby zahrnul: 1) aromatické sloučeniny: například benzen, toluen, xyleny, ethylbenzen: $\geq 5\ 000$ ppm; fenol: $\geq 6\ 000$ ppm, kresol, dimethylfenol: $\geq 1\ 000$ ppm; anthracen: ≥ 300 ppm; styren ≥ 5000 ppm; anilin: ≥ 150 ppm; naftalen: $\geq 1\ 000$ ppm; 1- nebo 2-methylnaftalen: ≥ 200 ppm; 2) nitroaromatické

sloučeniny: například nitrobenzen: ≥ 150 ppm; 3)
halogenaromatické sloučeniny: například chlorbenzen,
2- chlornaftalen: ≥ 200 ppm.

Mikroorganismy podle tohoto vynález mohou také degradovat následující sloučeniny při koncentracích nejméně 1000 ppm: pyren, acenaftylen, fluoranthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthen, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylová kyselina, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans- aldehyd kyseliny skořicové, mesitylen, salicylát, 2-, 3-, nebo 4-chlortoluen, 2-, 3-, nebo 4-chlorbenzoát, 1,3-dichlorbenzoát, 1-chlor-3-nitrobenzen, 1-chlor-4-nitrobenzen, 1,2-, 1,3-, nebo 1,4-dinitrobenzen, melamin, kyanuronová kyselina, hexadekan a δ -(-)-limonen.

Přednost se při selekčním procesu dává těm mikroorganismům, které jsou schopné růstu/metabolizmu na pevných površích a těm, které chemotakticky migrují k pevným povrchům.

Izolované mikroorganismy obecně konstitutivně neexprimují metabolické proteiny nezbytné pro degradaci požadovaných sloučenin, ale spíše musí být indukovány kultivací na médiu obsahujícím odpovídající sloučeninu nebo jejich směs nebo mediu obsahujícím sloučeninu, která indukuje enzymy cesty pro degradaci odpovídající sloučeniny / sloučenin. Ve zvláštním provedení médium obsahuje alespoň jednu sloučeninu vybranou z nitrobenzenu, anilinu, melaminu a kyanuronové kyseliny; a alespoň jednu sloučeninu vybranou z naftalenu, benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenu.

Navíc všechny izolované mikroorganismy patří k přirozeně se vyskytujícím kmenům, to znamená, že žádný z kmenů není modifikován rekombinantně.

Čisté a směsné kultury nových mikroorganismů podle tohoto vynálezu mohou být udržovány za použití média BACTO™ R2A (Difco, Detroit, Michigan). Použití BACTO™ R2A média jako udržovacího média představuje zaočkování média BACTO™ R2A čistou nebo směsnou kulturou podle tohoto vynálezu, kultivaci mikroorganismů při pokojové teplotě, to je asi 25 až 27 °C po dobu přibližně 48 hodin. Kultury mohou pak být pokryty materiálem, který tvoří bariéru průchodu vzduchu a vlhkosti, například vrstvou parafinů a uchovávány v chladu, například při asi 4 °C.

Alternativně mohou být čisté nebo směsné kultury mikroorganismů podle tohoto vynálezu udržovány kultivací za použití Stanierova minimálního média (Stanier a kol., 1966, J. Gen. Microbiol. 43: 159 - 271) doplněného 5 až 10 mM požadované aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické nebo halogenalifatické sloučeniny nebo jejich směsí. Podle výhodného provedení způsobu je udržován v doplněném Stanierově médiu poměr C : N přibližně 10 : 1 až 25 : 1. Kultury jsou udržovány za aerace, například použitím čistého kyslíku při 100 až 400 ml/min a za míchání. Po asi 24 hodinách kultivace na doplněném Stanierově médiu, jsou bakteriální buňky odstraněny z média odstředěním, opětně suspendovány buď v Stanierově minimálním médiu (SMM) nebo ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS) a získány z resuspenze odstředěním. Buněčné pelety mohou být uskladněny při asi 4 °C.

Alternativně mohou být směsné kultury udržovány následovně. Směsná kultura může být zaočkována do kompozice obsahující následující látky: 1) naftalen, výhodně mezi asi 1000 až 4000 ppm; 2) jednu nebo více ze sloučenin: benzen,

toluen, ethylbenzen a xylen, každý při asi 400 až 500 ppm;
3) buď chlornaftalen a/nebo methylnaftalen nebo oba při asi 200 ppm každého; a 4) anilin a/nebo nitrobenzen při asi 30 až 300 ppm každého, a zpracovány použitím systému fluidní fáze nebo pevné fáze, jak je popsáno níže v kapitole 6.3. Výhodně je poměr C : N : P asi 25 : 1 : 0,1 a kultura je udržována přibližně při pokojové teplotě během zpracovacího cyklu. Na konci zpracování může být obsah suspenzní fáze přefiltrován, například za použití filtru Whatman 1 nebo jiného ekvivalentního filtru, a odvodněná zbytková pevná látka označovaná jako „filtrační koláč“ obsahující indukované mikroorganismy může být použita k udržení směsné kultury vhodné pro použití podle tohoto vynálezu.

Některé z níže popsaných mikroorganismů jsou schopné využívat aerobně nitrobenzen jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie. Zvláště mikroorganismy označené jako DAP 111, DAP 119, DAP 622, DAP 623, DAP 626, DAP 629, DAP 632, DAP 115, DAP 120 a směsná kultura označená DAP-2 mohou aerobně rozkládat nitrobenzen. Mikroorganismy označené jako DAP 70, DAP 73, DAP 111, DAP 119 a DAP 622 a směsná kultura DAP 2 může aerobně rozkládat naftalen, methylnaftalen, chlornaftalen nebo anthracen. Mikroorganismy označené jako DAP 111, DAP 119 DAP 622, DAP 623, DAP 626, DAP 629, DAP 632, DAP 115, DAP 120 a směsná kultura DAP 2 mohou aerobně degradovat anilin. Navíc některé mikroorganismy níže popsané jsou schopné používat aerobně jako jediný zdroj uhlíku a/nebo dusíku a energie širokou škálu substituovaných a nesubstituovaných aromatických sloučenin, například benzen, toluen, anilin, fenol a ethylbenzen. Všechny čisté kultury mikroorganismů, které jsou níže popsány, využívají tyto sloučeniny aerobně. Bez toho, že by

bylo v úmyslu původců vynálezu se omezovat na jediný mechanismus působení, původci soudí, že sloučeniny jsou degradovány aerobně, z převážné části prostřednictvím ortho- nebo modifikované ortho cesty. Čisté a směsné kultury mohou degradovat sloučeniny na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Některé z níže popsaných mikroorganismů jsou také schopny využívat širokou škálu substituovaných a nesubstituovaných alifatických sloučenin aerobně, například δ -(-)-limonen, formaldehyd, chloroform a methanol. Navíc některé mikroorganismy jsou také schopny degradovat alifatické sloučeniny o delším řetězci. Posledně jmenovaná schopnost může být doložena například využitím hexadekanu jako jediného zdroje uhlíku a energie.

U všech mikroorganismů, které budou níže popsány, bylo zjištěno, že lépe rostou, to znamená, že buňky se rychleji vyvíjejí do větších kolonií, když jsou kultivovány na agarovém mediu o nízké hustotě, to je při asi 3 až 10 g agaru na litr média, výhodně při asi 3 g agaru na litr média. Níže popsané mikroorganismy mohou být kultivovány na agarovém mediu o normální hustotě, ale rostou pomaleji.

Pohyblivé mikroorganismy, které jsou níže popsány, jsou indukovány k tomu, aby vykazovaly chemotaxi, širokou škálou sloučenin. Chemotaxe je dosaženo dvěma různými způsoby pohybu, jmenovitě flagelárním a krátkým trhavým pohybem. Růstové podmínky dovolují mikroorganismům vykazovat kterýkoli z těchto dvou způsobů pohyblivosti. Například k dosažení flagelární pohyblivosti jsou mikroorganismy kultivovány v méně viskózních podmínkách, například v kapalném mediu nebo na agarových deskách, kde procentický obsah agaru je menší než asi 1 %, výhodně

0,3 %. K dosažení pohyblivosti krátkými trhavými pohyby jsou mikroorganismy kultivovány na pevném médiu, jako jsou agarové desky, kde procentický obsah agaru je asi 1 %. Pokud je procentický obsah agaru příliš vysoký, například asi 2 %, nebude pravděpodobně pozorován žádný z těchto dvou fenotypů chemotaxe. Určité pohyblivé mikroorganismy, zahrnující DAP 111 a DAP 119 vykazují za vhodných podmínek oba dva způsoby pohyblivosti.

Všechny čisté kultury, stejně jako směsná kultura, popsané níže v kapitole 6.1.1 až 6.1.5., včetně podkapitoly 6.1.5.1, byly deponovány ve sbírce „American Type Culture Collection“ (Americká typová sbírka kultur) (viz kapitolu 10, níže).

6.1.1 Mikroorganismy izolované za použití nitrobenzenu

Následující mikroorganismy byly izolovány z půdy za použití aerobní kultivace na minimálním médiu, obsahujícím pouze nitrobenzen jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie.

Mikroorganismus DAP 622:

DAP 622 je *Pseudomonas* sp., gram negativní pohyblivá tyčinka se vyskytuje příležitostně v párech a při růstu na kultivačním médiu je vzhled kolonií bílý až krémový. Objevuje se tvorba shluků a pohyblivost se jeví jako flagelární pokud mikroorganismus roste na flagelárních deskách. Mikroorganismus je schopen tvořit žluté barvivo, pokud roste na *Pseudomonas* F agaru (Difco). Mikroorganismus může dále využít jako jediný zdroj uhlíku a energie: laktát, chlorbenzen, ethylbenzen, salicylát, sukcinát. DAP 622 je dále charakterizován znaky uvedenými v tabulce 1.

Tabulka 1

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		vzniká H ₂ S
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(+)
	2-methylnaftalen	(+)
	α-ketoglutarát	(+)
	glyoxylát	(-)
	glutamát	(+)
	ethanol	(+)
	hexadekan	(-)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(-)
	neomycin	(-)
	tetracyklin	(-)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(-)

6.1.2 Mikroorganismy izolované za použití chlorbenzenu

Následující mikroorganismy byly izolovány z půdy za použití aerobní kultivace na minimálním médiu obsahujícím pouze chlorbenzen jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Mikroorganismus DAP 631:

DAP 631 je *Pseudomonas* sp., gram negativní slabě pohyblivá tyčinka se vyskytuje příležitostně v párech a při růstu na médiu BACTO™ R2A je vzhled kolonií bílý. Mikroorganismus může dále utilizovat jako jediný zdroj uhlíku a energie: laktát, chlorbenzen a ethylbenzen. DAP 631 je dále charakterizován znaky uvedenými v tabulce 2.

Tabulka 2

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(- až slabě)/(+)
utilizace citrátu		(-)
třícukerný železitý agar		vzniká H ₂ S
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(-)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(-)
	laktóza	(-)
	mannitol	(-)
	mannóza	(-)
	2-methylnaftalen	(-)
	α-ketoglutarát	(-)
	glyoxylát	(-)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(-)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(-)
ureáza		(-)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(-)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(-)
	neomycin	(-)
	tetracyklin	(-)
	spektinomycin	(-)
	streptomycin	(-)

Mikroorganismus DAP 68:

DAP 68 je *Aeromonas* sp., gram negativní pohyblivá tyčinka se vyskytuje příležitostně v párech a při růstu na médiu BACTO™ R2A je vzhled kolonií bílý až krémový.

Mikroorganismus může dále utilizovat jako jediný zdroj uhlíku a energie: laktát, chlorbenzen, ethylbenzen a sukcinát. DAP 68 je dále charakterizován znaky uvedenými v tabulce 3.

Tabulka 3

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(-)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		vzniká H ₂ S, kyselina a plyn z glukózy
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(+)
	mannitol	(+)
	mannóza	(+)
	2-methylnaftalen	(-)
	α-ketoglutarát	(+)
	glyoxylát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(-)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(+)
lysindekarboxyláza		(+)
ornithindekarboxyláza		(+)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
HgCl ₂		(R)
ampicillin		(R)
kanamycin		(R)
neomycin		(R)
tetracyklin		(R)
spektinomycin		(R)
streptomycin		(R)

Mikroorganismus DAP 66:

DAP 66 je *Corynebacterium* sp., gram variabilní, velká, nepohyblivá tyčinka se vyskytuje jednotlivě a v řetízcích. Některé řetízky dosahují velikosti vláken a některé jednotlivé tyčinky jsou pohyblivé. Je přítomna tvorba shluků a buňky mají pouzdra. Růst na deskách umožňujících krátké trhavé pohyby je obojetný. Při růstu na médiu BACTO™ R2A se kolonie jeví být tvrdé a voskovité. Tento organismus je pozitivní v testu na první enzym v metha cestě, katechol-2,3-dioxygenázu (C230), podle procedury určené Baylym a Wigmorem, 1973, J. Bacteriol. 113: 1112 - 1120. Mikroorganismus může dále utilizovat jako jediný zdroj uhlíku a energie: laktát, chlorbenzen, kyselinu m-toluylovou, ethylbenzen a sukcinát. DAP 661 je dále charakterizován znaky uvedenými v tabulce 4.

01.04.98

Tabulka 4

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(-)
třícukerný železitý agar		bez fermentace
růst při	15 °C	(-)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(-)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(-)
	2-methylnaftalen	(-)
	α -ketoglutarát	(-)
	glyoxylát	(-)
	glutamát	(-)
	ethanol	(+)
	hexadekan	(+)
NO ₃ → NO ₂		(-)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(-)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(R)
	neomycin	(-)
	tetracyklin	(-)
	spektinomycin	(-)
	streptomycin	(-)

6.1.3 Mikroorganismy izolované za použití naftalenu

Následující mikroorganismy byly izolovány z půdy za použití aerobní kultivace na minimálním médiu obsahujícím pouze naftalen jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Mikroorganismus DAP 70:

DAP 70 je *Pseudomonas* sp., gram negativní pohyblivá tyčinka, kde se tyčinky vyskytují jednotlivě, v párech nebo v dlouhých řetízcích, kde některé řetízky mohou dosahovat velikosti vláken. Při růstu na deskách, které to umožňují, vykazují flagelární pohyblivost a při růstu na médiu BACTO™ R2A je vzhled kolonií bílý. Navíc mikroorganismy vytváří rozsáhlé shluky. Mikroorganismy vykazují pozitivní test na první enzym v metha-cestě, katechol-2,3-dioxygenázu (C230) podle procedury určené Baylym a Wigmorem, 1973, J. Bacteriol. 113: 1112 - 1120. Mikroorganismus může dále utilizovat jako jediný zdroj uhlíku a energie: laktát, chlorbenzen, ethylbenzen a sukcinát. DAP 70 je dále charakterizován znaky uvedenými v tabulce 5.

Tabulka 5

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		kyselina z glukózy
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(-)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(+)
	mannitol	(+)
	mannóza	(-)
	2-methylnaftalen	(-)
	α -ketoglutarát	(-)
	glyoxylát	(+)
	glutamát	(-)
	ethanol	(+)
NO ₃ → NO ₂	hexadekan	(+)
		(-)
	arginindekarboxyláza	(-)
	lysindekarboxyláza	(-)
	ornithindekarboxyláza	(-)
hydrolýza želatiny		(-)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(R)
	neomycin	(R)
	tetracyklin	(R)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(R)

01.04.98

Mikroorganismus DAP 73:

DAP 73 je Zoogloea sp., gram variabilní pohyblivá tyčinka se vyskytuje jednotlivě a v párech. Růst na deskách umožňujících pohyblivost indikuje pohyblivost. Je přítomna tvorba shluků s mnoha prstovitými formami. Tento organismus je schopen produkovat žlutý pigment při růstu na Pseudomonas F Agar (Difco). Mikroorganismus může dále využít jako jediný zdroj uhlíku a energie; laktát, chlorbenzen a sukcinát. DAP 73 je dále charakterizován znaky uvedenými v tabulce 6.

01.04.98

Tabulka 6

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		kyselina z glukózy
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(+)
	2-methylnaftalen	(+)
	α-ketoglutarát	(+)
	glyoxylát	(-)
	glutamát	(+)
	ethanol	(+)
	hexadekan	(-)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(-)
	neomycin	(-)
	tetracyklin	(-)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(-)

6.1.4 Mikroorganismy izolované za použití nitrobenzenu a naftalenu

Následující mikroorganismy byly izolovány původně z půdy a aerobně kultivovány na čisté izoláty mikroorganismů. Tyto čisté izoláty mikroorganismů byly následně kultivovány aerobně spolu s kalem/odpadním materiálem obsahujícím směs sloučenin, například naftalen, výhodně mezi asi 1000 až 4000 ppm; benzen, toluen, ethylbenzen a xylen v množství asi 400 až 500 ppm každého; chlornaftalen a methylnaftalen v množství asi 200 ppm každého; a anilin a nitrobenzen v množství asi 30 až 300 ppm každého. Navíc byly ve směsi přítomny také substituované a nesubstituované alifatické sloučeniny. Čisté izoláty mikroorganismů byly získány z kultivačních látek za použití aerobní kultivace na minimálním mediu obsahujícím 150 ppm nitrobenzenu a 150 ppm naftalenu jako jediných zdrojů uhlíku, dusíku a energie.

Mikroorganismus DAP 111:

DAP 111 je *Pseudomonas* sp., gram negativní pohyblivá tyčinka se nalézá jak v párech, tak jednotlivě. Na mediu BACTO™ R2A je vzhled kolonií bílý a dochází k tvorbě určitých shluků. Byla pozorována pohyblivost jak na deskách umožňujících trhavý pohyb („twitching plates“), tak na flagelárních deskách. Navíc tyto organismy mohou utilizovat jako jediný zdroj uhlíku a energie následující látky: laktát, vanilin, chlorbenzen, ethylbenzen, kyanuronová kyselina, salicylát a sukcinát. DAP 111 je dále charakterizován, jak je ukázáno v tabulce 7.

Tabulka 7

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		vzniká H ₂ S
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(+)
	2-methylnaftalen	(+)
	α-ketoglutarát	(+)
	glyoxylát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(+)
	NO ₃ → NO ₂	(+)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(+)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(R)
	neomycin	(R)
	tetracyklin	(R)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(-)

Mikroorganismus DAP 119:

DAP 119 je *Aeromonas* sp., gram negativní pohyblivá tyčinka. Kolonie na médiu BACTO™ R2A jsou bílé, ale při růstu na nutričním bujónu jsou žluté. Aktivita trhavými pohyby je prokázána na deskách umožňujících krátké trhavé pohyby, a flagelární pohyblivost je prokázána při růstu na flagelárních deskách. Navíc tyto organismy mohou využít jako jediný zdroj uhlíku a energie následující látky: laktát, vanilin, chlorbenzen, ethylbenzen, kyanuronová kyselina, salicylát a sukcinát. DAP 119 je dále charakterizován v tabulce 8.

Tabulka 8

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		je produkován H ₂ S, kyselina a plyn z glukózy
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(+)
	mannitol	(+)
	mannóza	(+)
	2-methylnaftalen	(-)
	α-ketoglutarát	(+)
	glyoxylát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(+)
	hexadekan	(-)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(+)
lysindekarboxyláza		(+)
ornithindekarboxyláza		(+)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(R)
	neomycin	(R)
	tetracyklin	(R)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(R)

6.1.5 Směsná kultura mikroorganismů

Více než 200 různých čistých izolátů mikroorganismů bylo kultivováno z půdy na místě odběru. Všechny tyto čisté izoláty včetně těch, které byly popsány výše v kapitolách 6.1.1 až 6.1.4 byly smíchány a aerobně kultivovány s kalem/odpadním materiálem obsahujícím směs aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, alifatických a halogenalifatických sloučenin. Směsná kultura mikroorganismů byla získána z kultivovaného materiálu a byla udržována na médiu BACTO™ R2A (Difco, Detroit, Michigan).

Směsná kultura označená DAP-2 aerobně degraduje alespoň následující sloučeniny a jejich směsi: benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, 2-, 3- nebo 4-chlortoluen, 2-, 3- nebo 4- chlorbenzoát, 1,3-dichlorbenzoát, 1,2-, 1,3- nebo 1,4-dinitrobenzen, 1-chlor-3-nitrobenzen, 1-chlor-4-nitrobenzen, 1- nebo 2- methylnaftalen, pyren, acenaftylen, fluroanthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthren, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylová kyselina, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans- aldehyd kyseliny skořicové, mesitylen, salicylát, melamin, kyanuronová kyselina, δ -(-)-limonen, hexadekan, methanol, formaldehyd a chloroform.

6.1.5.1 Čisté izoláty ze směsných kultur

Byly izolovány a identifikovány následující směsné kultury označené jako DAP 2 izolací jednotlivých kolonií na

01.04.98

médiu BACTO™ R2A doplněném po 150 ppm nitrobenzenu, naftalenu a toluenu.

Mikroorganismus DAP 623:

DAP 623 je gram negativní pohyblivá tyčinka, obecně malé jednotlivé tyčinky, ačkoliv byly pozorovány i páry. Vybarvení může být nerovnoměrné a je pozorována tvorba určitých shluků. Kolonie na médiu BACTO™ R2A jsou bílé až krémovité. Navíc tyto organismy mohou využít následující látky: mesitylen, laktát, sukcinát, limonen, m-toluylovou kyselinu, chlorbenzen, salicylát, 2-, 3-, a 4-chlortoluen, 2-, 3- a 4-chlorbenzoovou kyselinu a 1,3-dichlorbenzen jako jediný zdroj uhlíku a energie. DAP 623 je dále charakterizován v tabulce 8A.

Tabulka 8A

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(-)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		kyselina z glukózy
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(+)
	2-methylnaftalen	(-)
	α -ketoglutarát	(+)
	glyoxylát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(-)
	$\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$	(+)
arginindekarboxyláza		(+)
lysindekarboxyláza		(+)
ornithindekarboxyláza		(+)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(-)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(-)
	tetracyklin	(R)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(-)

Mikroorganismus DAP 626:

DAP 626 je gram variabilní tyčinka, která se liší velikostí a vyskytuje se jednotlivě i v párech. Je pozorován růst na flagelárních deskách, který naznačuje flagelární pohyblivost. Navíc tyto organismy mohou utilizovat následující látky: mesitylen, laktát, sukcinát, limonen, acetát kyseliny skořicové, katechol, m-toluylovou kyselinu, chlorbenzen, 2-, 3- a 4-chlortoluen, 2-, 3- a 4-chlorbenzoovou kyselinu a 1,3-dichlorbenzen jako jediný zdroj uhlíku a energie. DAP 626 je dále charakterizován v tabulce 8B.

Tabulka 8B

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(-)
třícukerný železitý agar		vzniká H ₂ S
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(-)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(-)
	2-methylnaftalen	(-)
	α-ketoglutarát	(+)
	glyoxylát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(+)
	hexadekan	(+)
NO ₃ → NO ₂		(-)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(-)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(-)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(-)
	spektinomycin	(-)
	streptomycin	(R)

Mikroorganismus DAP 629:

DAP 629 je gram negativní malá pohyblivá tyčinka, skoro kokus. Kolonie na médiu BACTO™ R2A jsou bílé se slabou fluorescencí. Navíc tyto organismy mohou využít následující látky: fluoranthren, mesitylen, laktát, sukcinát, limonen, m-toluylovou kyselinu, chlorbenzen, 2-, 3- a 4-chlortoluen, 2-, 3- a 4-chlorbenzoovou kyselinu a 1,3-dichlorbenzen jako jediný zdroj uhlíku a energie. DAP 626 je dále charakterizován v tabulce 8C.

01.04.98

Tabulka 8C

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(-)
třícukerný železitý agar		bez fermentace
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(-)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(-)
	laktóza	(-)
	mannitol	(-)
	mannóza	(-)
	2-methylnaftalen	(-)
	α-ketoglutarát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(-)
		(+)
		(-)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(+)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(-)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(-)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(-)
	tetracyklin	(-)
	spektinomycin	(-)
	streptomycin	(-)

Mikroorganismus DAP 632:

DAP 632 je gram variabilní pohyblivá tenká tyčinka, vyskytující se jednotlivě nebo v párech. Kolonie na médiu BACTO™ R2A jsou krémové až nažloutlé. Navíc tyto organismy mohou utilizovat následující látky: fluoranthren, acenaftalen, mesitylen, laktát, limonen, m-toluylovou kyselinu, chlorbenzen, 2-, 3- a 4-chlortoluen, 2-, 3- a 4-chlorbenzoovou kyselinu a 1,3-dichlorbenzen jako jediný zdroj uhlíku a energie. DAP 632 je dále charakterizován v tabulce 8D.

Tabulka 8D

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(-)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		bez fermentace
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(-)
	fruktóza	(-)
	laktóza	(-)
	mannitol	(-)
	mannóza	(-)
	2-methylnaftalen	(-)
	α -ketoglutarát	(-)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(-)
NO ₃ → NO ₂		(-)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(R)
	tetracyklin	(R)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(R)

01.04.98

Mikroorganismus DAP 115:

DAP 115 je gram negativní pohyblivá tyčinka. Je pozorován růst na flagelárních deskách, což naznačuje flagelární pohyblivost. Kolonie na agaru BACTO™ R2A jsou bílé, ale na nutričním bujónu jsou žluté. Navíc tyto organismy mohou využít následující látky: benzo-(b)-fluoranthren, fluoranthren, dibenzofuran, acenaftalen, salicylát, laktát, sukcinát, glyoxylát, mesitylen, vanilin, limonen, acetát kyseliny skořicové, katechol, m-toluylovou kyselinu, chlorbenzen, 2-, 3- a 4-chlortoluen, 2-, 3- a 4-chlorbenzoovou kyselinu a 1,3-dichlorbenzen jako jediný zdroj uhlíku a energie. DAP 115 je dále charakterizován v tabulce 8E.

Tabulka 8E

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		je produkován H ₂ S, kyselina a plyn z glukózy
růst při	15 °C	(+/-)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(+)
	2-methylnaftalen	(+)
	α-ketoglutarát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(+)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(+)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(R)
	tetracyklin	(R)
	spektinomycin	(R)
	streptomycin	(R)

Mikroorganismus DAP 120:

DAP 120 je gram negativní pohyblivá tyčinka. Je pozorován růst na flagelárních deskách, což naznačuje flagelární pohyblivost. Navíc tyto organismy mohou využít následující látky: chrysen, pyren, laktát, sukcinát, glyoxylát, salicylát, mesitylen, vanilin, limonen, acetát kyseliny skořicové, katechol, m-toluylovou kyselinu, chlorbenzen, 2-, 3- a 4-chlortoluen, 2-, 3- a 4-chlorbenzoovou kyselinu a 1,3-dichlorbenzen jako jediný zdroj uhlíku a energie. DAP 120 je dále charakterizován v tabulce 8F.

01.04.98

Tabulka 8F

Diferenční charakteristika		Výsledek
kataláza/oxidáza		(+)/(+)
utilizace citrátu		(+)
třícukerný železitý agar		vzniká H ₂ S
růst při	15 °C	(+)
	25 °C	(+)
	35 °C	(+)
	41 °C	(+)
utilizace:	glukóza	(+)
	fruktóza	(+)
	laktóza	(-)
	mannitol	(+)
	mannóza	(-)
	2-methylnaftalen	(+)
	α-ketoglutarát	(+)
	glutamát	(+)
	ethanol	(-)
	hexadekan	(+)
NO ₃ → NO ₂		(+)
arginindekarboxyláza		(-)
lysindekarboxyláza		(-)
ornithindekarboxyláza		(-)
hydrolýza želatiny		(+)
ureáza		(+)
odolnost vůči antibiotikům:		
	HgCl ₂	(R)
	ampicillin	(R)
	kanamycin	(R)
	tetracyklin	(R)
	spektinomycin	(-)
	streptomycin	(-)

Následující tabulka 8G ukazuje, že výše popsané čisté kultury, izolované ze směsné kultury označené DAP 2 jsou schopny růstu pouze na Stanierově minimálním médiu, které bylo doplněno vždy 150 ppm nitrobenzenu, naftalenu a toluenu. Kultury byly kultivovány při 25 až 27 °C, velikosti kolonií byly určovány po 14 dnech. Hodnoty odpovídají průměru pěti paralelních kolonií pro každé stanovení.

Tabulka 8G

Kultura	Růst*	Velikost kolonií
DAP 626	++	3,8 mm
DAP 115	++/+++	5,0 mm
DAP 632	++/+++	4,7 mm
DAP 623	++	4,0 mm
DAP 120	+ / ++ ^a	a
DAP 629	++	4,3 mm

* Růst hodnocený jako ++++ bujný, +++ dobrý, ++ dostatečný, + slabý, +/- nedostatečný, - žádný

^a Nárůst kmene DAP 120 byl velmi tenký, ale rychle se rozprostírající, proto nebyla možná přesná kvantifikace.

Následující tabulka 8H ukazuje, že výše popsané čisté kultury, izolované ze směsné kultury označené DAP 2 jsou schopny využít melamin jako zdroj dusíku, jak bylo určeno velikostí kolonií těchto kultur. Kultury byly kultivovány na Stanierově minimálním médiu, které bylo doplněno vždy 150 ppm naftalenu a toluenu a 25 ppm melaminu jako buď jediným zdrojem dusíku nebo doplněny síranem amonným (NH₄)₂SO₄. Kultury byly kultivovány při 25 až 27 °C, velikosti kolonií byly určovány po 7 dnech. Hodnoty odpovídají průměru pěti paralelních kolonií pro každé stanovení.

Tabulka 8H

Kultura	s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	bez $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
DAP 626	3,2 mm	4,2 mm
DAP 115	5,2 mm	4,6 mm
DAP 632	4,9 mm	4,7 mm
DAP 623	4,1 mm	6,0 mm
DAP 120	4,3 mm	4,5 mm
DAP 629	3,9 mm	3,8 mm

6.1.6 Mikroorganismy, které nemohou rozkládat nitrobenzen

Z kalů nebo půd obsahujících nitrobenzen bylo izolováno a testováno na schopnost aerobně degradovat tuto sloučeninu množství mikroorganismů. Byly identifikovány následující kmeny, které nemohou degradovat nitrobenzen:

- (1) *Pseudomonas* sp. DN-1081; (2) *Pseudomonas* sp. DN-1101-1;
(3) *Pseudomonas* sp. DN-1018; (4) *Pseudomonas* sp. DN-1019;
(5) *Pseudomonas* sp. DR-1111-1; a (6) *Pseudomonas* sp. DR-1111-2.

6.2. Způsoby aerobního rozkladu sloučenin

Podle jednoho provedení tohoto vynálezu je předkládán způsob aerobní degradace aromatických a/nebo substituovaných aromatických sloučenin. Obecně způsob představuje kontaktování aromatické sloučeniny se směsnou nebo čistou kulturou mikroorganismů, přičemž uvedené mikroorganismy jsou vybrány ze skupiny obsahující mikroorganismy, které mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. V jednom provedení tohoto způsobu je aerobně degradována alespoň

jedna sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické nebo halogenalifatické sloučeniny. V jiném provedení tohoto způsobu je aerobně degradována směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny. Způsob může dále zahrnovat kultivaci mikroorganismů v kontaktu s uvedenou sloučeninou / sloučeninami tak, že aromatická sloučenina nebo sloučeniny jsou degradované na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Podle dalšího provedení tohoto vynálezu způsob zahrnuje použití mikroorganismů vybraných ze skupiny tvořené mikroorganismy, které mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725 k degradaci alespoň jedné aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické a/nebo halogennitroaromatické sloučeniny v celkové koncentraci asi 10 ppm až 100 000 ppm na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu během asi 2 až 72 hodin.

Ve výhodném provedení, jestliže jsou například přítomny aromatické sloučeniny obsahující dusík, jsou degradovány na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu a sloučeniny obsahující dusík, které vykazují malou nebo žádnou hrozbu pro biosféru.

Jak bylo výše uvedeno, aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, které jsou degradovány podle vynálezu, zahrnují, ale nejsou omezeny na sloučeniny, jako je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen,

chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, 2-, 3- nebo 4-chlortoluen, 2-, 3- nebo 4- chlorbenzoát, 1,3-dichlorbenzoát, 1,2-, 1,3- nebo 1,4-dinitrobenzen, 1-chlor-3-nitrobenzen, 1-chlor-4-nitrobenzen, 1- nebo 2- methylnaftalen, pyren, acenaftylen, fluroanthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthen, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylová kyselina, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans- aldehyd kyseliny skořicové, melamin, kyanuronová kyselina, mesitylen a salicylát.

Podle jiného provedení vynálezu je předkládán způsob aerobní degradace alifatických sloučenin. Tyto alifatické sloučeniny zahrnují ale nejsou omezeny na δ -(-)-limonen, hexadekan, methanol, formaldehyd a chloroform. Obecně způsob představuje kontaktování alifatických nebo halogenalifatických sloučenin nebo směsi uvedených sloučenin s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat kultivaci mikroorganismů v kontaktu s uvedenou sloučeninou nebo směsí sloučenin tak, že uvedená sloučenina nebo směs sloučenin je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Mikroorganismy mohou degradovat vysoké koncentrace sloučenin, které mají být degradovány tak, že vysoké koncentrace neinterferují se skutečnou degradací.

Tyto metody mohou dále zahrnovat monitorování odstraňování příslušných aromatických nebo alifatických sloučenin nebo sloučeniny. Například měření absorpce kyslíku nebo uvolňování oxidu uhličitého může být použito k monitorování degradace příslušné sloučeniny nebo

sloučenin. Navíc je k zhodnocení úrovně biologické aktivity vhodné pH a/nebo pufrovací kapacita.

Sloučeniny, které mají být degradovány, mohou být v pevné, kapalné a/nebo plynné formě. Pokud je sloučenina v plynné a/nebo kapalné formě, může být sorbována na materiálu, jako je pevná látka.

V ideálním případě, když metoda zahrnuje kultivování mikroorganismů, podmínky kultivace by měly být takové, že se podporuje bakteriální růst, například pH mezi 3,0 a 11,0, výhodně mezi 6,0 a 8,0; teplota mezi 4 °C a 41 °C, výhodně mezi 4 °C a 40 °C; tlak rozpuštěného kyslíku mezi 0,1 % a 100 %, výhodně mezi 4 % a 80 %, zvláště výhodně mezi 4 % a 40 % nasycení, kdy kyslík může být dodáván použitím kompozice obsahující kyslík nebo uvolňující kyslík. Kyslík obsahující nebo kyslík uvolňující kompozicí může být vzduch, čistý kyslík, peroxid, nebo jiné peroxysloučeniny, které uvolňují kyslík, nebo jejich směsi.

Kultivační medium může být dále mícháno nebo nemusí být mícháno, s pozitivním tlakem rozpuštěného kyslíku nebo bez, a dále může nebo nemusí být doplněno živinami k udržení optimálního poměru uhlík : dusík : fosfor mezi 10 : 1 : 0,1 a 50 : 1 : 1, výhodně 25 : 1 : 0,1. Ve výhodném provedení je limitujícím prvkem bakteriálního růstu pouze uhlík.

Podle tohoto vynálezu může být použita jakákoli metoda kontaktu mikroorganismů s kompozicí obsahující jakoukoli nebo více výše uvedených sloučenin nebo jejich směsí. Tyto metody kontaktování zahrnují ale nejsou omezeny na kontakt in situ, například v prostředí kontaminovaném takovou sloučeninou nebo jejich směsí, kontakt v uzavřené nádobě nebo kontejneru atd.

6.3. Systém fluidní fáze pro aerobní reakci sloučenin

Podle jiného provedení vynálezu jsou předkládány systémy ve fluidní fázi a způsoby pro aerobní reakci sloučenin. Obecně fluidní fázové systémy představují konverzi elastomerní pevné látky nebo kalu na fluidní kompozici vhodnou pro aerobní reakci organických sloučenin obsažených v elastomerní pevné látce nebo kalu. Aerobní reakce, pro které jsou vhodné fluidní kompozice, zahrnují syntetické stejně jako degradativní reakce, které probíhají výhodně za aerobních podmínek.

Způsob přípravy fluidní kompozice vhodné pro aerobní reakci zahrnuje kroky: a) partikularizace elastomerní pevné látky nebo kalu obsahujícího organickou sloučeninu; a b) kontaktování partikularizované pevné látky nebo kalu v nádobě s proudem tekutiny vybrané ze skupiny zahrnující kyslík, kyslík obsahující plyn, včetně vzduchu, vodu a vodný roztok tak, že je partikularizovaná pevná látka nebo kal suspendován v proudu tekutiny za vzniku fluidní kompozice vhodné pro aerobní reakci organické sloučeniny obsažené v pevné látce nebo kalu.

Elastomerní pevná látka nebo kal mohou být partikularizovány směřováním elastomerní pevné látky nebo kalu, například v kolovém mlýně, lopatkovém směšovači nebo v šnekovém směšovači. Velikost partikularizovaného materiálu se bude lišit v závislosti na množství faktorů, včetně takových, jako je velikost lopatek mlýnu nebo směšovače, vzdálenost mezi lopatkami a stěnou mlýna nebo směšovače, množství činidla proti slepování, pokud se přidává, a stupeň a rychlost směšování.

Způsob může dále zahrnovat směšování elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování buď současně

nebo následně po kroku a). V jednom provedení je činidlo proti slepování vybráno ze skupiny zahrnující jíly, nakrájené, nasekané nebo jinak jemně rozdělené organické materiály, práškovité anorganické soli a kamenný prášek. V alternativním provedení je činidlo proti slepování vybráno ze skupiny zahrnující práškové vápno, portlandský cement, bentonitovou hlinku, piliny, infuzoriovou hlinku, práškovité klasy a jejich směsi. Činidlo proti slepování může být použito v rozsahu od asi 2 do 100 % (hmotn./hmotn.).

Ve zvláštním provedení tohoto způsobu podle vynálezu je fluidní kompozice použita k částečné konverzi aromatické sloučeniny na cis-cis mukonát, který je vhodný k přípravě užitečných polymerů. V alternativním zvláštním provedení způsobu podle vynálezu fluidní kompozice zahrnuje kompozice obsahující uhlovodíky jako jsou pryskyřičné výrobky, například α -pinen a/nebo β -pinen a činidlo proti slepování. Fluidní kompozice se výhodně používá jako okysličeného paliva, které má za následek čistší zplodiny.

V jiném zvláštním případě provedení tohoto vynálezu je fluidní kompozice použita pro reakci, která zahrnuje aerobní degradaci organické sloučeniny vybrané ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické nebo halogenalifatické sloučeniny. Například fluidní kompozice obsahující partikularizovaný kal obsahující nitrobenzen, suspenovaná v proudu vody nebo vodném roztoku je kontaktována za aerobních podmínek s mikroorganismy vybranými ze skupiny tvořené mikroorganismy, které mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725 tak, že

nitrobenzen ve fluidních kompozicích je degradován na produkty obsahující oxid uhličitý a vodu. Obrázek 1 b představuje schéma jednoho systému fluidní fáze vhodného pro tento způsob podle vynálezu. Ilustruje systém pro dodávání energie ve formě mechanické energie pro vznik suspenze.

Podle jiného provedení tohoto vynálezu jsou předkládány systémy fluidní fáze a způsoby aerobní degradace sloučenin. Vytváří se fluidní fáze, která představuje suspenzi vytvořenou například z pevné látky, půdy, a/nebo kalu. Suspenze jsou použity například pro zpracování aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických nebo halogenalifatických sloučenin v pevných látkách, půdách a/nebo kalech pomocí mikroorganismů, které mohou působit na tyto sloučeniny.

Fluidní fáze, která představuje suspenzi, může být tvořena buď z neeslatomerních nebo elastomerních pevných látek, kalů nebo půd. Tyto suspenze jsou použity k aerobní degradaci aromatické nebo alifatické sloučeniny nebo jejich směsi obsažené v uvedené pevné látce, kalu nebo půdě.

Příprava suspenzí podle tohoto vynálezu za použití elastomerních pevných látek, kalů a/nebo půd je zvláště výhodná pro aerobní degradaci aromatických nebo alifatických sloučenin obsažených v takovýchto kompozicích za použití mikroorganismů uvedených v této přihlášce.

Příprava suspenzí, stejně jako systémy a způsoby pro aerobní degradaci pomocí mikroorganismů za použití suspenzí, je popsána v následujících podkapitolách.

6.3.1. Příprava suspenzních fází

Příprava suspenzních fází vhodných pro toto provedení je schematicky ilustrována na obrázku 2a - b. Obrázek 2a ilustruje tvorbu suspenze za použití neelastomerní pevné látky, kalu nebo půdy. Tento způsob zahrnuje a) kontaktování uvedené pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem; a b) zavedení energie do uvedené kombinace pevná látka nebo kal/vodna v nádobě tak, že uvedená pevná látka nebo kal je fluidizována na suspenzi.

Energie může být zavedena například zavedením mechanické energie, například mícháním; zavedením akustické energie; například zaváděním akustických vln do materiálů suspenze; nebo zaváděním elektrického nebo elektrostatického pole. Obrázek 1a také ilustruje jeden příkladný způsob provedení vynálezu, ve kterém je zaváděna mechanická energie, například mícháním.

Jak je uvedeno na obrázku 2a, pH uvedené suspenze může být upraveno směrem k neutrálnímu, pokud je to nezbytné, například pokud se má suspenze kontaktovat s mikroorganismy k degradaci sloučeniny nebo směsi sloučenin v uvedené suspenzi.

Obrázek 2b ilustruje tvorbu suspenze z elastomerní pevné látky, kalu nebo půdy. V jednom alternativním provedení metoda zahrnuje a) smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem; b) zavedení energie do uvedené kombinace elastomerní pevná látka nebo kal/voda, takže uvedená pevná látka nebo kal je fluidizována na suspenzi; a c) oddělení uvedené suspenze od jakékoli reziduální elastomerní pevné látky nebo kalu. Separace může být provedena například dekantací suspenze od reziduálního elastomeru. Alternativně způsob zahrnuje a)

smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování za vzniku kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování; b) smísení uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování s vodou nebo vodným roztokem; a c) zavedení energie do uvedené vodné kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování tak, že uvedená nelepivá pevná látka nebo kal je fluidizována na suspenzi. Způsob může dále zahrnovat míchání uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování za vzniku nelepivé pevné látky nebo kalu. V ještě další alternativě způsob zahrnuje a) směšování elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování a vodou nebo vodným roztokem; a b) zavádění energie do uvedené směsi vytvořené v kroku a) tak, že uvedená elastomerní pevná látka nebo kal je fluidizována na suspenzi.

Energie může být zavedena například zavedením mechanické energie, například mícháním; zavedením akustické energie, například akustických vln do suspenzních materiálů; nebo zavedením elektrického nebo elektrostatického pole. Obrázek 1a ilustruje jedno příkladné provedení vynálezu, ve kterém je zavedena mechanická energie například mícháním.

Vhodná činidla proti slepování pro přípravu suspenze podle vynálezu zahrnují, ale nejsou limitována na, jíly, drcené, rozřezané nebo jinak jemně rozdělené organické materiály, práškové anorganické soli a kamenný prach. Další vhodná činidla proti slepování zahrnují práškové vápno, portlandský cement, bentonitovou hlínu, piliny, infuzoriovou hlínu, práškové klasy a jejich směsi.

Vodné roztoky použité k přípravě suspenze podle vynálezu mohou být filtráty po předtím provedeném biologickém čištění v suspenzní fázi, jak je zde popsáno.

Jak je uvedeno na obrázku 2b, kterékoli z alternativních provedení výše popsaných mohou dále zahrnovat úpravu pH uvedené suspenze k neutrálnímu, pokud je to požadováno.

Výše popsané způsoby tvorby suspenzní fáze z elastomerní pevné látku, kalu nebo půdy obsahujících aromatickou nebo alifatickou sloučeninu nebo jejich směs jsou zvláště výhodné, protože tyto suspenze, které mohou zahrnovat asi 45 % (hmotn./hmotn.) původní elastomerní pevné látky nebo kalu, jsou vhodné ve způsobech ve fluidní fázi pro aerobní degradaci uvedených sloučenin nebo jejich směsí. Před tímto vynálezem nebylo možné zpracování těchto elastomerních materiálů v suspenzní fázi.

Suspenze jsou tak vhodné pro způsoby biologického čištění, ve kterých jsou aerobně zpracovány pevné látky, kaly, půdy nebo jiné odpadní materiály, ve kterých jsou obsaženy aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické nebo halogenalifatické sloučeniny nebo sloučenina nebo jejich směsi.

Jestliže jsou v těchto pevných látkách, kalech, půdách nebo jiných odpadních materiálech obsaženy těkavé sloučeniny, mohou být odstraněny stripováním z materiálů, během směřování s činidlem proti slepování. Proto mohou být tyto kroky prováděny takovým způsobem, že těkavé látky jsou zachycovány například v biofiltru. Jakmile jsou zachyceny v biofiltru, těkavé látky mohou být zpracovány mikroorganismy, jak je popsáno níže v kapitole 6.5.

6.3.2. Mikroorganismy/inokulum pro degradaci v suspenzní fázi

Čisté kultury mikroorganismů nebo směsné kultury mikroorganismů vybraných z těch, které jsou popsány ve výše uvedené kapitole 6.1, byly použity jako inokulum pro způsoby využívající suspenzní fázi. Použité mikroorganismy byly vybrány na základě jejich schopnosti aerobně degradovat požadovanou přítomnou sloučeninu nebo směs sloučenin v konkrétní suspenzi.

Mikroorganismy byly indukovány, jak bylo výše popsáno v kapitole 6.1, jejich kultivací například na médiu, které obsahovalo jako jediný zdroj živin sloučeninu / sloučeniny, které měly být degradovány.

Alternativně může být použito jako inokula pro způsob v suspenzní fázi zbylých pevných látek z dříve prováděného biologického čištění v suspenzní fázi, které obsahují již indukované mikroorganismy. Tak například poté, co byla suspenze biologicky přečištěna, může být filtrována. Filtrát může být použit pro přípravu další suspenze a odvodněné zbylé pevné reziduum, nazývané „filtrační koláč“, které již obsahuje indukované mikroorganismy, je přidáno do suspenze, která má být biologicky přečištěna.

Jestliže je použit filtrační koláč jako zdroj směsné kultury inokula, je použito například 200 až 600 gramů filtračního koláče a výhodně mezi 350 až 450 gramy filtračního koláče, k nastartování 4 litrové várky. Jakmile byla aromatická nebo alifatická sloučenina nebo jejich směs degradována, obsah 4 litrové várky může být použit jako zdroj inokula pro 10 galonovou várku, a ta pak může být použita pro iniciování 150 galonové várky. Tato technika

může být rozšířena a extrapolována pro přípravu inokula pro stále větší reaktory.

Jestliže není filtrační koláč dostupný, inokulum může být znovu získáno použitím uložených kultur mikroorganismů, které jsou popsány v kapitole 6.1.1 až 6.1.4, k zaočkování několika desek uloženými mikroorganismy. Desky obsahující Stanierovo minimální medium doplněné příslušným uhlovodíkem / uhlovodíky je poté inkubováno při 25 °C. Po nárůstu kultur jsou desky opláchnuty 5 až 10 ml Stanierova minimálního media. Oplachy jsou shromažďovány a použity k zaočkování série dvoufázových baněk s mediem doplněným agarem a příslušným uhlovodíkem / uhlovodíky, a 50 ml kapalného media stejného složení. Po nárůstu zaočkovaných mikroorganismů v dvoufázové baňce je povrch vrstvy agaru oškrábán pro odstranění buněk. Kapalná vrstva ze 4 baněk může být použita k zaočkování čtyřlitrové nádoby. Od tohoto bodu je další propagace identická s tou, která je použita v případě, kdy je použit jako zdroj inokula filtrační koláč.

6.3.3. Způsoby v suspenzní fázi a parametry biologického zpracování

Podle tohoto vynálezu způsob biologického čištění v suspenzní fázi pevných látek, kalů nebo půd obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny zahrnuje a) úpravu pH suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a b) kontaktování uvedené suspenze s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648,

55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou suspenzí tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu. Způsob může být prováděn v nádobě, jako je bioreaktor.

Jiný způsob biologického čištění pevných látek, kalů nebo půd v suspenzní fázi obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny zahrnuje a) smíchání uvedené pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem; b) zavedení energie do uvedené kombinace pevná látka nebo kal/voda v nádobě tak, že uvedená pevná látka nebo kal je fluidizován na suspenzi; c) úpravu pH uvedené suspenze, pokud je to třeba; a d) kontaktování uvedené neutrální suspenze s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Energie může být zavedena za použití jakékoli metody pro tvorbu suspenze zmiňované v kapitole 6.3.1. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou suspenzí tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Jestliže je pevnou látkou, kalem nebo půdou dehtovitá nebo elastomerní pevná látka, kal nebo půda, způsob zahrnuje a) smíchání uvedené pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem; b) zavedení energie do uvedené

kombinace pevná látka nebo kal/voda v nádobě tak, že uvedená pevná látka nebo kal je fluidizován na suspenzi; c) oddělení uvedené suspenze od jakékoli reziduální elastomerní pevné látky nebo kalu; d) úpravu pH uvedené suspenze, pokud je to třeba; a e) kontaktování uvedené neutrální suspenze s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Energie může být zavedena za použití jakékoli metody pro tvorbu suspenze zmiňované v kapitole 6.3.1. Navíc způsob může také zahrnovat postupné přidávání reziduální elastomerní pevné látky nebo kalu do neutrální suspenze v kontaktu s uvedenými mikroorganismy v kroku e).

Jestliže pevná látka, kal nebo půda, které mají být zpracovány v suspenzní fázi, je dehtovitá nebo elastomerní pevná látka, kal nebo půda obsahující alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny, způsob zahrnuje alternativně a) smíchání uvedené elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování; b) smíchání uvedené kombinace pevná látka nebo kal / činidlo proti slepování za vzniku nelepivé pevné látky nebo kalu; c) smíchání uvedené nelepivé pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem; d) zavádění energie do uvedené nelepivé pevné látky nebo kalu tak, že uvedená nelepivá pevná látka nebo kal je fluidizován na suspenzi; e) úpravu pH uvedené suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a f) kontaktování uvedené neutrální suspenze s mikroorganismy,

příčemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Energie může být zavedena za použití jakékoli metody pro tvorbu suspenze zmiňované v kapitole 6.3.1. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou suspenzí tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Jiný způsob biologického čištění pevné látky, kalu nebo půdy v suspenzní fázi, když je pevná látka, kal nebo půda dehtovitá nebo elastomerní pevná látka, kal nebo půda obsahující alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny, zahrnuje a) smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování a s vodou nebo vodným roztokem za vzniku směsi; b) zavedení energie do uvedené směsi vytvořené v kroku a) tak, že uvedená elastomerní pevná látka, kal nebo půda je fluidizována na suspenzi; c) úpravu pH uvedené suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a d) kontaktování uvedené neutrální suspenze s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Energie může být zavedena za použití jakékoli metody pro tvorbu suspenze zmiňované v kapitole 6.3.1. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou suspenzí tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

Dehtovitá nebo elastomerní pevná látka, kal nebo půda v jakékoli z výše uvedených metod může být reziduální elastomerní pevná látka, kal nebo půda vytvořená, jak je popsáno podle způsobů podle vynálezu. V každém případě může reziduální elastomerní pevná látka, kal nebo dehet obsahovat velmi vysoké koncentrace sloučenin, které mohou být účinně degradovány podle způsobů podle tohoto vynálezu.

V jednom provedení je sloučenina obsažená v pevné látce, kalu, půdě nebo jiném odpadním materiálu vybrána z benzenu, toluenu, xylenu, ethylbenzenu, naftalenu, chlorbenzenu, fenolu, kresolu, nitrobenzenu, anilinu, anthracenu, dimethylfenolu, styrenu, halogennaftalenu, 2-, 3- nebo 4-chlortoluenu, 2-, 3- nebo 4- chlorbenzoátu, 1,3-dichlorbenzoátu, 1,2-, 1,3- nebo 1,4-dinitrobenzenu, 1-chlor-3-nitrobenzenu, 1-chlor-4-nitrobenzenu, 1- nebo 2-methylnaftalenu, pyrenu, acenaftyleny, fluoranthenu, fenanthrenu, benzo-(b)-fluoranthenu, dibenzofuranu, chrysenu, katecholu, m-toluylové kyseliny, acetátu kyseliny skořicové, vanilinu, trans- aldehydu kyseliny skořicové, mesitylenu, salicylátu, melaminu, kyanuronové kyseliny, δ -(-)-limonenu, hexadekanu, methanolu, formaldehydu a chloroformu nebo směsi uvedených sloučenin.

Vhodná činidla proti slepování jsou vybrána z jílu, řezaných, sekaných nebo jinak jemně rozdělených organických látek, práškových anorganických solí a kamenného prachu. Alternativně jsou činidla proti slepování vybrána z práškového vápna, portlandského cementu, bentonitového jílu, pilin, infuzoriové hlínky, práškovitých klasů a jejich směsí. V jiném provedení je sloučenina vybrána z methanolu, formaldehydu nebo chloroformu.

Podle výhodného provedení je činidlo proti slepování vybráno z anorganických činidel, jako je kamenný prach, infuzoriová hlínka atd.

Směs suspenze / mikroorganismy je udržována za podmínek, které umožňují růst bakterií a biodegradaci žádané sloučeniny / sloučenin. Obecně, by měly být podmínky takové, že je podporován bakteriální růst, například pH mezi asi 3,0 a 11,0, výhodně mezi 6,0 a 8,0; a teplota mezi asi 4 °C a 41 °C, výhodně mezi 15 °C a 37 °C. Tlak rozpuštěného kyslíku by měl být mezi asi 0,1 % a 100 %, výhodně mezi 4 % a 80 %, výhodněji mezi 4 % a 30 %. Tlak rozpuštěného kyslíku může být monitorován a udržován v žádaných mezích dodáváním kyslíku ve formě vzduchu, čistého kyslíku, peroxidu, a/nebo jiných peroxidových kompozic, které uvolňují kyslík. Směs může být míchána nebo nemusí být míchána, může být vytvářen pozitivní tlak rozpuštěného kyslíku nebo ne, a zásobní živiny mohou nebo nemusí být přidávány k udržení optimálního poměru uhlík : dusík : fosfor mezi asi 10 : 1 : 0,1 a 50 : 1 : 1, výhodně 25 : 1 : 0,1, tak, že pouze uhlík je limitující pro bakteriální růst. Navíc může být přidán ve vodě rozpustný polymerní koagulant / flokulant jako je MAGNIFLOC® 591C, kvarterní amoniový kationtový polymer o molekulové hmotnosti asi 300 kD až 500 kD (Cytec Industries, West Paterson, NJ) pro zlepšení filtrovatelnosti a usazovacích vlastností pevných látek v bioreaktoru se suspenzní fází. Usazené pevné látky mohou být použity jako inokulum pro následný proces bioremediace (biologického čištění).

V různých časových bodech se mohou odstranit pevné látky nebo kapaliny, například extrakcí pomocí methylenchloridu : methanolu (90 : 10) nebo pomocí

metodologie EPA pro TCLP nebo TCL, a měřením koncentrace vybraných sloučenin / vybrané sloučeniny pomocí plynové chromatografie.

6.3.4. Pracovní postup

Způsoby aerobní reakce sloučenin ve fluidní fázi v tomto vynálezu mohou by prováděny řadou způsobů, které zahrnují vsádkový způsob, sekvenční vsádkový způsob a kontinuální nebo semikontinuální způsob. Tři způsoby práce jsou popsány níže v pracovních postupech pro způsoby aerobní degradaci aromatických nebo alifatických sloučenin nebo jejich směsi v suspenzní fázi; avšak tyto níže popsané pracovní postupy mohou být použity také pro způsoby aerobní reakce organické sloučeniny ve fluidní kompozici, jak bylo popsáno výše.

Ve všech třech pracovních postupech mohou být vzorky obsahu periodicky odebírány k monitorování degradace žádané sloučeniny nebo sloučenin. Navíc pohyb nebo míchání obsahu reaktoru může vyvolávat pění. V těchto případech mohou být přidána odpěňovadla k zabránění pění. Vhodná odpěňovadla zahrnují například odpěňovací emulze obsahující křemík (například Dow ANTIFOAM-A®; činidlo proti pění na bázi křemíku).

6.3.4.1. Vsádkový způsob

Vsádkový způsob zahrnuje umístění suspenze obsahující sloučeninu nebo směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogenitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny do nádoby, jako je

bioreaktor, zaočkování indukovanými mikroorganismy, jak je popsáno v kapitole 6.1.1 až 6.1.4, a inkubaci směsi kultury mikroorganismů tak, že je degradována aromatická nebo alifatická sloučenina nebo sloučeniny. Po předem určené době je inkubace zastavena a obsah je odstraněn a pevné látky jsou odděleny od kapaliny pomocí filtrace. Poté se mohou odebrat vzorky jak z pevné tak kapalné fáze, které jsou dále zkoumány, například pomocí TCLP nebo plynovou chromatografií, aby se posoudila koncentrace sloučeniny / sloučenin k potvrzení, že sloučenina / sloučeniny byla / byly degradována / degradovány. Pevné látky z reaktoru jsou následně odvodněny a mohou být dále zpracovány například jako zavlážka nebo mohou být použity jako bakteriální inokulum pro další várku. Ve vsádkovém způsobu je odvodněné pevné reziduum znovu přidáno v množství asi 2 % až 40 % hmotnostních nebo objemových, výhodně asi 5 % až 20 %. (viz například obrázek 1c).

Obrázek 1b ilustruje typické složení reaktoru, kterého může být užito pro vsádkový způsob stejně jako pro jiné způsoby práce, které jsou popsány níže. Neutralizovaná suspenze a inokulum jsou umístěny v bioreaktoru. Do reaktoru může být vháněn vzduch nebo kyslík a obsah bioreaktoru může být mechanicky míchán.

6.3.4.2. Sekvenční vsádkový způsob

Sekvenční vsádkový způsob je prováděn většinou stejně jako vsádkový způsob s tou výjimkou, že poté, co je dokončena inkubační perioda, se ponechá reaktor usadit po určitou dobu, obvykle asi 15 minut, a vrchních 60 až 95 % obsahu reaktoru je odčerpáno, přičemž usazené pevné látky na dně zůstávají jako inokulum pro příští várku

neutralizované suspenze. Výhodně je odstraněno mezi 70 % a 90 % obsahu. Sekvenční vsádkový způsob představuje výhodné provedení aerobní degradace v suspenzní fázi, protože je redukováno zpoždění nebo fáze aklimatizace, v reaktoru zůstává vysoké množství biomasy, lépe se přizpůsobuje variabilitě kompozice odpadních živin a dochází k silné redukci reziduálních pevných látek po biologickém zpracování.

Při použití reziduálních pevných látek jako zdroje inokula pro následné kolo jak u sekvenčního vsádkového, tak u vsádkového způsobu, a při použití zbytkové kapaliny nebo filtrátu pro přípravu čerstvé suspenze se pracuje při čistých ztrátách vody. To má za následek, že nevzniká žádný vodný výstup.

6.3.4.3. Semikontinuální způsob

Semikontinuální způsob je podobný jak vsádkovému, tak sekvenčním vsádkovému způsobu. Avšak místo zastavení inkubace po předem určeném čase, čerstvá suspenze je čerpána do bioreaktoru ve stálém množství během dané časové periody, během které je také zpracovávaná suspenze vyčerpávána z bioreaktoru. To poskytuje kontinuální zpracování suspenze bez nutnosti zastavit biodegradační proces.

6.4. Degradace v pevné fázi

Jiné provedení tohoto vynálezu je zaměřeno na způsoby aerobní degradace látek v pevné fázi. Toto provedení zahrnuje způsob zpracování pevných látek, kalů, včetně těch, které mají dehtovitou a/nebo elastomerní povahu,

stejně jako půd, sedimentů a sorpčních materiálů, které zahrnují, ale nejsou omezeny na granulované aktivní uhlí, přičemž uvedené materiály obsahují alespoň jednu sloučeninu nebo směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny obsahující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny.

6.4.1. Metody v pevné fázi a parametry biologického zpracování

Způsob pro biologické čištění pevných látek, kalů nebo půd obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs alespoň dvou sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny v pevné fázi zahrnuje a) míchání uvedené pevné látky, kalu nebo půdy s objemovým činidlem tak, že může vzduch snadno procházet zbytnělou směsí; b) úpravu pH zbytnělé směsi k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a c) kontaktování uvedené zbytnělé směsi s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou zbytnělou pevnou látkou, kalem nebo půdou tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu. V jednom provedení je sloučenina obsažená v pevné látce, kalu, půdě nebo jiném odpadním materiálu vybrána ze skupiny zahrnující benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen,

fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, 2-, 3- nebo 4-chlortoluen, 2-, 3- nebo 4- chlorbenzoát, 1,3-dichlorbenzoát, 1,2-, 1,3- nebo 1,4-dinitrobenzen, 1-chlor-3-nitrobenzen, 1-chlor-4-nitrobenzen, 1- nebo 2-methylnaftalen, pyren, acenaftylen, fluroanthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthren, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylovou kyselinu, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans- aldehyd kyseliny skořicové, mesitylen, salicylat, melamin a kyanuronovou kyselinu nebo směs uvedených sloučenin. V jiném provedení je sloučenina obsažená v pevné látce, kalu nebo půdě vybrána z methanolu, formaldehydu, chloroformu, δ -(-)-limonenu a hexadekanu nebo směsi uvedených sloučenin.

Kde pevné látky, kaly nebo půdy jsou dehtovité nebo elastomerní pevné látky, kaly nebo půdy obsahující alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny sestávající z aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických a halogenalifatických sloučenin, způsob biologického čištění v pevné fázi zahrnuje: a) smísení dehtovité nebo elastomerní pevné látky, dehtovitého nebo elastomerního kalu nebo dehtovité nebo elastomerní půdy s činidlem proti slepování tak, že uvedená pevná látka, půda nebo kal tvoří partikularizovanou směs, která je méně dehtovitá a/nebo elastomerní; b) úpravu pH uvedené směsi k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a c) kontaktování uvedené směsi s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat smíchání partikularizované

dehtovité nebo elastomerní pevné látky, dehtovitého nebo elastomerního kalu nebo dehtovité nebo elastomerní půdy s objemovým činidlem buď současně nebo následně po kroku a).

Vhodná činidla proti slepování jsou vybrána z jílu, nařezaných, drcených nebo jinak jemně rozdělených organických materiálů, práškovitých anorganických solí a kamenného prachu. Alternativně jsou činidla proti slepování vybrána z práškového vápna, portlandského cementu, bentonitového jílu, pilin, křemeliny, na prášek rozdrcených klasů a jejich směsí.

Vhodná objemová činidla jsou vybrána ze skupiny zahrnující nařezané, nadrcené nebo jinak jemně rozdělené organické látky a anorganické soli. Konkrétněji, objemová činidla jsou vybrána ze skupiny, která zahrnuje dřevěné odštěpky, piliny, klasy a jejich směsí.

Podle výhodného provedení může objemové činidlo sloužit také jako činidlo proti slepování, přičemž zahrnuje, ale není omezeno na například dřevěné odštěpky, piliny, klasy a jejich směsí.

6.4.2. Mikroorganismy / inokulum pro degradaci v pevné fázi

Čisté kultury mikroorganismů nebo směsné kultury mikroorganismů vybraných z těch, které jsou popsány ve výše uvedené kapitole 6.1 byly použity jako inokulum pro způsoby využívající pevnou fázi. Použité mikroorganismy byly vybrány na základě jejich schopnosti aerobně degradovat požadovanou přítomnou sloučeninu nebo směs sloučenin v konkrétní pevné látce.

Mikroorganismy byly indukovány, jak bylo výše popsáno v kapitole 6.1 jejich kultivací, například na médiu, které obsahovalo jako jediný zdroj živin sloučeninu / sloučeniny, které měly být degradovány.

Alternativně může být použito jako inokula pro způsob v pevné fázi zbylých pevných látek z dříve prováděného biologického čištění v pevné fázi, které obsahují již indukované mikroorganismy. Tak například poté, co byla hromada pevných látek biologicky přečištěna, obsahuje už indukované mikroorganismy, které mohou být přidány do jiné hromady k biologickému čištění.

Jestliže biologicky čištěná hromada není dostupná, inokulum může být znovu získáno použitím uložených kultur mikroorganismů, které jsou popsány v kapitolách 6.1.1 až 6.1.4 k zaočkování několika desek uloženými mikroorganismy. Desky obsahující Stanierovo minimální medium doplněné příslušným uhlovodíkem / uhlovodíky jsou poté inkubovány při 25 °C. Po nárůstu kultur jsou desky opláchnuty 5 až 10 ml Stanierova minimálního media. Oplach je shromažďován a použit k zaočkování dvoufázových baněk s mediem doplněným agarem a příslušným uhlovodíkem / uhlovodíky, a 50 ml kapalného media stejného složení. Po nárůstu mikroorganismů zaočkovaných v dvoufázové baňce, je povrch vrstvy agaru oškrábán pro odstranění buněk. Kapalná vrstva ze 4 baněk může být použita k zaočkování hromady. Tento postup může být uzpůsoben pro jakoukoli požadovanou velikost, jak je popsáno výše v kapitole 6.3.2.

6.4.3 Zpracování pevných látek

Poté, co je zbytnělá, neutralizovaná a zaočkovaná pevná látka umístěna v kompostovacím bioreaktoru nebo

nádobě, je inkubována po předem určený čas, během něhož je například proháněn přes tento materiál kyslík nebo vzduch nebo jejich směs k zajištění aerobní degradace sloučeniny / sloučenin. Pevný materiál může být příležitostně míchán, ale nedoporučuje se to v případě pevných látek, které mají vysoký obsah těkavých sloučenin. Navíc, jak je popsáno výše, pevné látky mohou být odstraněny z bioreaktoru nebo nádoby a být extrahovány, například methylenchloridem : methanolem (90 : 10), k zjištění koncentrace vybrané sloučeniny / sloučenin pomocí plynové chromatografie nebo pomocí procedury TCLP.

6.5. Biofiltry

Jiné provedení tohoto vynálezu představuje biofiltr a způsob jeho použití. Biofiltry jsou použity při biologickém čištění u sloučenin v médiích, jako je vzduch, páry, aerosoly, voda nebo vodné roztoky.

Biofiltry podle tohoto vynálezu obsahují aparát, který má mikroorganismy imobilizované na pevném nosiči, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Vhodné pevné nosiče zahrnují ale nejsou omezeny na granulované aktivní uhlí, dřevěné odštěpky, aluminu, ruthenium, oxid železa, keramiku nebo alginát. Tyto aparáty mohou mít vtokový a výtokový otvor, takže materiál, který má být zpracován, může procházet aparátem.

Biofiltry mohou být použity například pro biologické čištění médií obsahujících sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické,

halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny. Způsob zahrnuje průchod uvedeného média přes biofiltr, který zahrnuje aparát, který má mikroorganismy imobilizované na pevném nosiči, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725. Způsob může dále zahrnovat monitorování vystupujícího média pro zjištění, zda sloučenina / sloučeniny byly skutečně degradovány.

6.6. Dvoustupňový způsob degradace

Podle dalšího provedení vynálezu je předkládán dvoustupňový způsob aerobní degradace odpadních látek obsahujících alespoň jednu sloučeninu, vybranou ze silně halogenovaných organických sloučenin, jako jsou polychlorované bifenyly, polybromované bifenyly atd., silně nitrované organické sloučeniny, jako je trinitrotoluen atd., a silně nitrované a zesíťované polymerní sloučeniny, například nitrocelulóza atd. Odpadní látky mohou dále obsahovat sloučeninu vybranou ze skupiny obsahující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenované alifatické sloučeniny nebo směsi těchto sloučenin. Tento způsob zahrnuje: a) smísení reagentu schopného chemicky degradovat, alespoň částečně, silně halogenovanou, silně nitrovanou nebo silně nitrovanou zesíťovanou sloučeninu v odpadním materiálu za vzniku předzpracované kompozice; a b) kontaktování uvedené předzpracované kompozice s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní

číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55726, 55727, 55724 a 55725.

Způsob může dále zahrnovat kultivaci uvedených mikroorganismů tak, že alespoň jedna uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu. Podle jednoho způsobu provedení jsou degradovány odpadní materiály, které obsahují alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny obsahující benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, 2-, 3- nebo 4-chlortoluen, 2-, 3- nebo 4- chlorbenzoát, 1,3-dichlorbenzoát, 1,2-, 1,3- nebo 1,4-dinitrobenzen, 1-chlor-3-nitrobenzen, 1-chlor-4-nitrobenzen, 1- nebo 2- methylnaftalen, pyren, acenaftylen, fluroanthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthren, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylovou kyselinu, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans- aldehyd kyseliny skořicové, mesitylen, salicylat, melamin, kyanuronovou kyselinu, methanol, formaldehyd, chloroform, δ -(-)-limonen a hexadekan. Reagent může být, ale není omezen na, Fentonovo činidlo, které je směsí peroxidu vodíku a síranu železnatého. Další příklady zahrnují, ale nejsou limitovány na, volné radikály, UV záření, kovové železo, peroxidázové enzymy, jako jsou ligninové enzymy a jim podobné enzymy. Tyto reagenty částečně rozkládají těžce odbouratelnou sloučeninu / sloučeniny na sloučeninu, kterou mohou mikroorganismy degradovat, takže mikroorganismy nyní mohou dokončit degradaci sloučeniny / sloučenin.

7. Příklad: Uchování a indukování (nabuzení) mikroorganismů

Směsné kultury izolovaných mikroorganismů byly udržovány na 1,5 až 2,0 ml média BACTO™ R2A (Difco, Detroit, Michigan) v 4,0 ml Wheatonových ampulích. Kultury naočkované na udržovací médium byly inkubovány při 25 až 27 °C pro dobu 48 hodin. Po této inkubaci byly kultury obaleny parafilmem a uloženy při 4 °C.

V jedné řadě pokusů byla směsná kultura indukována návratem uložené kultury do okolní teploty a převedením směsné kultury na 1% agarové bakteriální desky s čerstvým médiem BACTO™ R2A doplněným 1000 až 4000 ppm naftalenu, 30 až 3000 ppm nitrobenzenu, 400 až 500 ppm benzenu, 400 až 500 ppm toluenu, 400 až 500 ppm xylenů, 30 až 300 ppm anilinu, 400 až 500 ppm ethylbenzenu, 50 až 300 ppm chlorbenzenu a asi 200 ppm 2-chlornaftalenu. Desky byly inkubovány po dobu 48 až 96 hodin při 25 až 27 °C. Kultury byly poté převedeny na bakteriální desky se Stanierovým minimálním médiem (Stanier a kol., 1966, J. Gen. Microbiol. 43: 159 - 271) doplněným stejnými uhlovodíkovými sloučeninami, jak byly uvedeny výše, a inkubovány dalších 48 hodin při 25 až 27 °C. Po inkubaci byly desky opláchnuty 5 až 10 ml Stanierova minimálního media, oplachy byly sbírány a použity k inkubaci v dvoufázových baňkách. Dvoufázové baňky obsahovaly 75 ml Stanierova minimálního media (kapalina) ve vrchní vrstvě a 50 ml Stanierova minimálního media s 2 % agaru. Jak vrchní vrstva, tak spodní vrstva byly doplněny výše uvedenými uhlovodíky. Baňky byly inkubovány při 25 až 27 °C po dobu 48 až 96 hodin. Buňky, nyní indukované, byly seškrábnuty z povrchu agaru a použity jako inokulum.

V jiné řadě pokusů byla směsná kultura indukována návratem uložené kultury do okolní teploty a převedením směsné kultury na 0,3% agarové bakteriální desky s čerstvým médiem BACTO™ R2A doplněným 1000 až 4000 ppm naftalenu, 30 až 300 ppm nitrobenzenu, 400 až 500 benzenu, 400 až 500 ppm toluenu, 400 až 500 ppm xylenů, 30 až 300 ppm anilinu, 400 až 500 ppm ethylbenzenu, 50 až 300 ppm chlorbenzenu, 200 ppm 2-methylnaftalenu a asi 200 ppm 2-chlornaftalenu. Desky byly inkubovány po dobu 48 až 96 hodin při 25 až 27 °C. Kultury byly poté převedeny na bakteriální desky se Stanierovým minimálním médiem (Stanier a kol., 1966, J. Gen. Microbiol. 43: 159 - 271) doplněným stejnými uhlovodíkovými sloučeninami, jak byly uvedeny výše, a inkubovány dalších 48 hodin při 25 až 27 °C. Po inkubaci byly desky opláchnuty 5 až 10 ml Stanierova minimálního media, oplachy byly sbírány a použity k inkubaci v dvoufázových baňkách. Dvoufázové baňky obsahovaly 75 ml Stanierova minimálního media (kapalina) ve vrchní vrstvě a 50 ml Stanierova minimálního media s 2 % agaru. Jak vrchní vrstva, tak spodní vrstva byly doplněny výše uvedenými uhlovodíky. Baňky byly inkubovány při 25 až 27 °C po dobu 48 až 96 hodin. Buňky, nyní indukované, byly seškrábnuty z povrchu agaru a použity jako inokulum.

8. Příklad: Degradace v suspenzní fázi

8.1 Příklad: Vsádkový způsob degradace

Elastomerní kaly obsahující směs aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických a halogenovaných alifatických sloučenin o vysokém obsahu byly fluidizovány

jak je popsáno ve výše uvedené kapitole 6.3, smícháním elastomerního kalu s vodou.

Tabulka 9 ukazuje průměrnou koncentraci vybraných sloučenin v ppm, která byla zjištěna v původním elastomerním kalu.

Tabulka 9

Sloučenina	(průměrná koncentrace v ppm)
chloroform	680
benzen	720
toluen	3 000
chlorbenzen	130
ethylbenzen	240
o-xylen	680
anilin	630
nitrobenzen	720
naftalen	42 000
2-methylnaftalen	2 800
2-chlornaftalen	< 100
m,p-xylen	2 300

Po smísení byla suspenze oddekantována od reziduálního elastomerního kalu za vzniku asi 30% (hmotn./hmotn.) suspenze a přivedena do běžné míchané nádoby (B. Braun, Allentown, PA). Suspenze byla neutralizována na pH asi 7 přidávkem NaOH (2 N) a zaočkována asi 10% (obj./obj.) směsnou kulturou indukovaných mikroorganismů. Tyto uhlovodíkové sloučeniny přítomné v elastomerním kalu byly jediným zdrojem uhlíku a energie pro tyto mikroorganismy.

Nádoba o objemu 4 l obsahující zaočkovanou neutralizovanou suspenzi byla míchána při asi 200 až

700 ot./min., výhodně 400 ot./min. při pokojové teplotě po dobu 24 hodin a provzdušňována čistým kyslíkem při asi 15 psi, 250 ml/min. Ze suspenze byl odebrán vzorek před a po 24 hodinovém biologickém zpracování ke zjištění koncentrace sloučenin přítomných v suspenzi. Suspenze byla extrahována za použití TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Protocol) a analyzována plynovou chromatografií, jak je popsáno v EPA SW-846. Jak je vidět v tabulce 10, sloučeniny přítomné v suspenzi, které byly podrobeny analýze, byly úspěšně biologicky odbourány.

Tabulka 10

30% suspenze

Sloučenina	TCL nezpracovaná*	TCLP zpracovaná*	limity TCLP
chloroform	314	< 1	6,0
benzen	94	< 0,5	0,5
toluen	509	< 1	***
chlorbenzen	18	< 1	100,00
ethylbenzen	15	< 0,5	***
o-xylen	61	< 0,5	***
anilin	114	< 1	***
nitrobenzen	39	< 1	2,0
naftalen	3249	< 5	***

* koncentrace v ppm

*** limity TCLP nestanoveny

Vystupující plyn obsahující stripované těkavé organické sloučeniny (VOC - volatile organic compounds) a oxid uhličitý byl jímán ve dvou nádobách s granulovaným aktivním uhlím a ve dvou nádobách s alkalií (2N KOH). Po 24

hodinách inkubace bylo ztraceno méně než 2 % celkově přítomných těkavých organických sloučenin díky stripování.

Obrázek 3 dále ukazuje korelaci mezi snižujícím se množstvím přítomných sloučenin a narůstajícím množstvím oxidu uhličitého produkovaného mikroorganismy. Protože byla nádoba provzdušňována čistým kyslíkem, jakákoli produkce oxidu uhličitého byla přímým důsledkem mikrobiální aerobní utilizace sloučenin přítomných v suspenzi. Obrázek 3 tak také ukazuje, že mikroorganismy byly schopny využít sloučeniny přítomné v původní suspenzi jako jediný zdroj uhlíku a energie a že tyto sloučeniny byly degradovány na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

8.2 Sekvenční vsádkový způsob degradace: Příklad 1

Stejný elastomerní kal, jako byl použit v kapitole 8.1, byl fluidizován, neutralizován a zaočkován stejným způsobem inokulem směsné kultury. Avšak místo zastavení degradace sloučenin každých 24 hodin pro úplné vyprázdnění a naplnění nádoby pro nový cyklus biologického čištění, byla odčerpána jenom část obsahu reaktoru. Po dobu 30 dnů po každých 24 hodinách inkubace vyjma víkendů, byl obsah nádoby ponechán usadit na 15 minut. Jakmile došlo k usazení pevných částic v nádobě, 80 % biologicky čištěné suspenze bylo odčerpáno z vršku nádoby. Stejně množství čerstvé nepřečištěné 30% suspenze (hmotn./hmotn.) ze stejného zdroje bylo přidáno do nádoby. Obsah nádoby byl pak promícháván a provzdušňován čistým kyslíkem po dobu dalších 24 hodin, jak je popsáno v kapitole 8.1.

40 ml vzorky obsahu nádrže byly odebírány před a po každém 24 hodinovém cyklu, extrahovány systémem methylenchlorid : methanol (90 : 10) a analyzovány na obsah

naftalenu pomocí plynové chromatografie, jak je popsáno v kapitole 8.1. Obrázek 4 ukazuje, že aerobní degradace naftalenu za použití sekvenčního vsádkového způsobu po dobu 30 dnů byla rychlá a úplná, že přítomné mikroorganismy tolerovaly značné změny obsahu naftalenu, 700 ppm až 4 700 ppm, a že tyto velké změny měly malý nebo žádný účinek na schopnost mikroorganismů aerobně využít naftalen a degradovat ho na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

8.3. Sekvenční vsádkový způsob degradace: Příklad 2

Neelastomerní pevná látka byla fluidizována s vodou za vzniku 30% (hmotn./hmotn.) suspenze. Tabulka 11 ukazuje koncentrace různých vybraných sloučenin, které byly zjištěny v původní pevné látce v ppm (parts per million).

Tabulka 11

Sloučenina	rozmezí koncentrace (ppm)
chloroform	< 10
benzen	2005 - 2284
toluen	38 - 42
chlorbenzen	1914 - 2112
ethylbenzen	521 - 578
o-xylen	803 - 887
anilin	301 - 331
nitrobenzen	321 - 256
naftalen	37 - 40
2-methylnaftalen	654 - 729
2-chlornaftalen	< 10
m,p-xylen	2126 - 2362

Produkovaná 30% (hmotn./hmotn.) suspenze, která měla alkalické pH, byla neutralizována pomocí 30% (hmotn./hmotn.) suspenze s kyselým pH produkované z elastomerního kalu podle kapitoly 8.1 v poměru 1 : 1. Následně byla přidána 2N kyselina sírová, aby se pH výsledné směsi těchto dvou suspenzí dostalo na neutrální pH. Směsná kultura indukovaných mikroorganismů 5 až 20% (hmotn./obj.), výhodně asi 10%, byla přidána k neutralizované suspenzi a směs byla míchána a provzdušňována čistým kyslíkem po dobu 24 hodin. Po inkubaci byl obsah ponechán sednout po dobu 15 minut a poté bylo 80 % objemu odčerpáno z vršku. Byla opět přidána čerstvá zneutralizovaná suspenze, jak byla výše popsána, a obsah nádoby byl opět promíchán a provzdušňován. Z nádoby byl odebíráán vzorek před a po každé 24 hodinové inkubaci, který byl dále analyzován na obsah benzenu a naftalenu. Obrázek 5 ukazuje úspěšné biologické přečištění od benzenu a naftalenu přítomných v suspenzi během 30 dnů.

8.4 Příklad: Vsádkový způsob degradace

Neutralizovaná 30% (hmotn./hmotn.) suspenze vyrobená z elastomerního kalu a 33% (hmotn./hmotn.) neutralizovaná suspenze vyrobená z jiného elastomerního kalu byly smíchány v poměru 1 : 1. Výše uvedená tabulka 9 a tabulka 12 ukazují průměrnou koncentraci určitých vybraných sloučenin v každém individuálním elastomerním kalu v ppm.

01.04.93

Tabulka 12

Sloučenina	průměrná koncentrace v ppm
chloroform	1 000
benzen	68 000
toluen	16 000
chlorbenzen	200
ethylbenzen	670
o-xylen	1 000
anilin	1 500
nitrobenzen	1 200
naftalen	16 000
2-methylnaftalen	1 300
2-chlornaftalen	150
m,p-xylen	3 500

Suspenzní směs byla přidána do míchané nádoby a zaočkována indukovanou směsnou kulturou mikroorganismů. Obsah nádoby byl míchán a provzdušňován čistým kyslíkem při pokojové teplotě po dobu 40 hodin. Vzorke obsahu nádoby odebírané před inkubací, po 16 hodinách a po 40 hodinách byly extrahovány systémem methylenchlorid : methanol (90 : 10) a analyzovány plynovou chromatografií, jak je výše popsáno. Tabulka 13 ukazuje, že u analyzovaných sloučenin došlo k úspěšnému biologickému přečištění pomocí mikroorganismů.

Tabulka 13

Sloučenina	TCL nezpracovaná*	TCL t = 16 hod.*	TCL t = 40 hod. *
chloroform	480	< 10	< 10
toluen	190	90	< 10
chlorbenzen	190	< 10	< 10
ethylbenzen	< 10	< 10	< 10
m,p-xylen	100	90	< 10
anilin	80	14	< 10
nitrobenzen	40	13	< 10
naftalen	5 100	140	50
2-methyl- naftalen	180	130	30

* koncentrace v ppm

9. Příklad: Degradace v pevné fázi podobná kompostování

Degradace v pevné fázi může být prováděna v komoře, navršené hromadě, hromadě a podobně.

9.1 Příklad: Ztráty těkavých organických sloučenin

Pět individuálních elastomerních kalů obsahujících směs vysokých koncentrací aromatických, nitroaromatických, halogenaromatických, halogennitroaromatických, alifatických a halogenalifatických sloučenin byla zpracována individuálně smísením v hnětacím stroji s pilinami k zjištění potenciálních ztrát organických těkavých sloučenin (VOC) jako je například benzen, v důsledku stripování během přípravy materiálu pro aerobní degradaci sloučenin v materiálech podle způsobu podle vynálezu.

Elastomerní kal a objemové činidlo, piliny, byly nadávkovány do hnětacího stroje. U kalů 1 až 3 a 5

zahrnovalo objemové činidlo 20 % směsi, zatímco u kalu 4 objemové činidlo zahrnovalo 25 % směsi. Za míchání byl proháněn prostorem u hlavy hnětacího stroje dusíkový plyn pro zabránění spálení jakéhokoliv přítomného spalitelného materiálu. Vzorky pro analýzu byly odebírány před a po smísení a relativní množství benzenu a chlorbenzeny byla stanovena pomocí plynové chromatografie.

Tabulka 14

pevný materiál	% organických látek znovu získaných po předběžném zpracování	
	benzen	chlorbenzen
1	60 - 90	80
2	90	100
3	70	85
4	75 - 90	80 - 95
5	5 - 25	60 - 75

Jak je patrné z tabulky 14, pro 4 z 5 testovaných kalů byly ztráty benzenu v důsledku stripování pouze mezi 6 a 26 %. Avšak pro jeden testovaný kal byly ztráty benzenu mezi 70 a 90 % původního množství přítomného benzenu. Chlorbenzen byl stripován v menším rozsahu, ale kal, který ztratil většinu benzenu ztratil také většinu chlorbenzeny. Tento kal byl unikátní v tom, že měl pH větší než 10,5, zatímco ostatní kaly byly více méně kyselé. Tyto výsledky demonstrují, že pH konkrétního kalu nebo pevné látky může ovlivňovat stupeň ztrát těkavých organických sloučenin během zpracování.

9.2 Degradace v pevné fázi podobná kompostování: Příklad 1

Půda obsahující směs organických sloučenin, například benzen, toluen, nitrobenzen, naftalen, chlorbenzen, chloroform, xylen, anilin a ethylbenzen byla smíšena v hnětacím stroji s objemovým činidlem, to je pilinami. Směs 80 % půdy / 20 % pilin byla neutralizována přídavkem NaOH. Neutralizovaná směs byla umístěna do nádoby, zaočkována indukovanou kapalnou směsnou kulturou mikroorganismů, a směs byla zpracovávána po dobu 14 dnů jako hromada. Utěsněné nádoby byly drženy pod vakuem za účelem prohánění směsi vzduchem. Vhodný průchod vzduchu směsí byl dosažen prostřednictvím sítě perforovaných hadic, které byly umístěny pod směsí. Odcházející vzduch byl proháněn přes dva lapače s granulovaným aktivním uhlím (granulated activated carbon GAC) pro jímání těkavých organických sloučenin (VOC). Během kompostování byl udržován konstantní obsah vlhkosti a průtok vzduchu. Vzorky půdy byly před a po kompostování odebrány a extrahovány pomocí systému methylenchlorid : methanol (90 : 10) nebo pomocí TCLP a analyzovány plynovou chromatografií na vybrané sloučeniny, například benzen a nitrobenzen. Tabulka 15 ukazuje dvě nezávislé zpracování stejného materiálu. Jsou uvedeny koncentrace vybraných sloučenin v ppm nalezené v zbytnělé půdě před a po kompostování analyzované jak extrakcí rozpouštědlem (methylenchlorid : methanol), tak TCLP, stejně jako procentické zastoupení těkavých organických sloučenin jak ve zbytkovém materiálu, tak těch, které byly stripovány a jímány v GAC lapačích. Biologické čištění v pevné fázi byla schopna redukovat koncentraci analyzovaných sloučenin na TCLP limity.

Tabulka 15

Půda

Podmínky: zaočkována, 30 až 45 % vlhkosti, 0,25 slpm průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem) *		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	21,0	< 10	< 0,5	---	64,0
chlorbenzen	< 10	< 10	< 1	---	---
nitrobenzen	< 10	< 10	< 2	---	---
naftalen	736,0	17,0	---	2,3	1,7

Půda

Podmínky: zaočkováno, 30 až 45 % vlhkosti, 0,25 slpm průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem) *		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	47,0	< 10	< 0,5	---	33,0
chlorbenzen	< 10	< 10	< 1	---	---
nitrobenzen	< 10	< 10	< 2	---	---
naftalen	1245,0	31,0	---	2,5	0,9

* TCL

9.3 Degradace v pevné fázi podobná kompostování: příklad 2

Dehtovitá půda obsahující směs organických sloučenin byla smísena v hnětacím stroji s objemovým činidlem, to je

pilinami. Směs dehtovitá půda/piliny (80 : 20) byla neutralizována smísením s NaOH a umístěna v nádrži. Neutralizovaná směs byla zaočkována indukovanou kapalnou směsí kultur a nádoba byla uzavřena. Směs byla zpracována a analyzována stejně, jak je popsáno v kapitole 9.2. Tabulka 16 ukazuje dvě nezávislá úspěšná biologická zpracování dehtovité půdy. Zbytnělý materiál byl úspěšně přečištěn jak od benzenu, tak chlorbenzenu, jak bylo vyhodnoceno TCLP.

Tabulka 16

Dehtovitá půda

Podmínky: zaočkováno, 30 až 40 % vlhkosti, 0,25 slpm
průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpouštědlem) *		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	4377,0	< 10	< 0,05	---	61,0
chlorbenzen	6606,0	62,0	< 1	0,1	64,3
nitrobenzen	74,0	70,0	< 2	94,6	7,0
naftalen	4075,0	3038,0	3,0	74,6	3,0

Dehtovitá půda

Podmínky: zaočkováno, 30 až 50 % vlhkosti, 0,25 slpm průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem) *	TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	% zbylé v materiálu	% těk. GAC
	původní (ppm)	konečná (ppm)			
benzen	4137,0	< 10	nest. **	---	51,4
chlorbenzen	6065,0	30,0		0,5	63,9
nitrobenzen	< 10	< 10		---	---
naftalen	3967,0	2533,0		63,9	3,9
* TCL					
** nestanoveno					

Významné procento jak benzenu (63 %), tak chlorbenzenu (35,5 %) bylo rychle odstraněno stripováním během prvních dvou dnů zpracování, následné odstraňování probíhalo pomaleji. Více než 40 % naftalenu bylo odstraněno během zpracování pomocí mírného stripování (4 %), což naznačuje, že odstranění bylo hlavně následkem aerobní degradace sloučenin pomocí přítomných mikroorganismů.

9.4. Degradace v pevné fázi podobná kompostování: příklad 3

Dehtovitá půda byla smísením s pilinami v hnětacím stroji upravena tak, aby nabyla na objemu a přestala se slepovat. Tato směs byla neutralizována pomocí NaOH a umístěna do nádrže. Směs byla zaočkována indukovanou kapalnou směsnou kulturou a nádoba byla uzavřena. Zaočkováná směs byla zpracována tak, jak je popsáno v kapitole 9.2. Jak je uvedeno v tabulce 17, bylo dosaženo

dvou nezávislých úspěšných biologických přečištění
dehtovitých půd.

Tabulka 17

Dehtovitá půda

Podmínky: zaočkováno, 40 až 50 % vlhkosti, 0,25 slpm
průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem) *		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	25320,0	< 10	< 0,5	---	15,1
chlorbenzen	77,0	< 10	< 1	---	8,6
nitrobenzen	104,0	47,0	< 2	0,5	11,3
naftalen	10758,0	8206,0	5,0	76,3	3,3

Dehtovitá půda

Podmínky: zaočkováno, 35 až 50 % vlhkosti, 0,25 slpm průtok
vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem) *		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	25000,0	< 10	< 0,5	---	13,0
chlorbenzen	81,0	< 10	< 1	---	63,0
nitrobenzen	87,0	48,0	< 2	55,2	13,1
naftalen	10440,0	8905,0	8,0	85,3	3,8

* TCL

Dehtovitá půda obsahovala velmi vysokou koncentraci benzenu (25 000 ppm) a menší množství chlorbenzenu a nitrobenzenu. Biologické zpracování v pevné fázi bylo schopno snížit koncentraci těchto sloučenin na limity TCLP. Konečná koncentrace benzenu byla menší než 10 ppm. Rychlé odstranění sloučeniny mikroorganismy probíhalo v prvních 48 hodinách a odstranění na TCLP limity bylo dosaženo během jednoho týdne. Avšak pouze 20 až 25 % naftalenu bylo odstraněno mikroorganismy po 14 dnech.

9.5 Degradace v pevné fázi podobná kompostování: příklad 4

Elastomerní kal byl smísením s pilinami v hnětacím stroji upraven tak, aby nabyl na objemu a přestal se slepovat. Při promíchávání byl prostorem hlavy zaváděn dusíkový plyn pro zabránění spalování hořlavých materiálů. Zbytnělý a nelepivý kal byl umístěn do nádoby a pH bylo upraveno na neutrální přidavkem NaOH. Neutralizovaná směs kalu a pilin byla zaočkována indukovanou kapalnou směsnou kulturou a nádoba byla uzavřena. Materiál byl zpracováván jako hromada po dobu 14 dnů tak, jak je popsáno v kapitole 9.2. Tabulka 18 ukazuje, že bylo dosaženo dvou úspěšných nezávislých biologických zpracování elastomerního kalu.

01.04.98

Tabulka 18

Kal

Podmínky: zaočkováno, 30 až 50 % vlhkosti, 0,25 slpm
průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem)*		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	99,0	< 10	< 0,5	---	93,8
chlorbenzen	40,0	< 10	< 1	---	56,4
nitrobenzen	449,0	< 10	2,0	---	16,5
naftalen	15341,0	84,0	1,0	0,5	1,8

Kal

Podmínky: zaočkováno, 30 až 50 % vlhkosti, 0,25 slpm průtok
vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem)*		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	89,0	< 10	< 0,5	---	109,0
chlorbenzen	38,0	< 10	< 1	---	6,5
nitrobenzen	454,0	< 10	< 1	---	13,9
naftalen	13380,0	280,0	< 1	2,1	1,6

* TCL

Elastomerní kal byl úspěšně přečištěn od benzenu a nitrobenzenu. Konečná koncentrace obou sloučenin byla menší než 10 ppm. Kromě toho, byl degradován naftalen na méně než 330 ppm z původních 13 000 až 15 000 ppm. Avšak nikoli

01.04.98

veškeré odstranění těchto sloučenin bylo v důsledku aerobního biologického čištění. Více než (90 %) benzenu a přibližně (15 %) nitrobenzenu bylo odvedeno ze směsi stripováním během prvních dvou dnů. Na druhé straně stripování nebylo hlavním mechanismem odstranění pro naftalen a chlorbenzen, což naznačuje, že jejich odstranění bylo převážně důsledkem aerobní degradace sloučeniny přidanými mikroorganismy.

9.6 Degradace v pevné fázi podobná kompostování: příklad 5

Dehtovitý kal obsahující vysoké koncentrace směsi benzenu, chlorbenzenu, nitrobenzenu a naftalenu smísením s pilinami (25 % hmotn./hmotn.) nabral na objemu a byla také snížena tímto smísením jeho dehtovitost. Zbytnělý kal byl neutralizován pomocí NaOH a umístěn v nádobě. Neutralizovaný a zbytnělý kal byl zaočkován kapalnou směsnou kulturou mikroorganismů (2 až 10 % hmotn./obj.) a nádoba byla uzavřena. Směs kalu, pilin a mikroorganismů byla zpracována jako hromada po dobu 14 dnů. Směs byla úspěšně přečištěna od testovaných sloučenin. Tabulka 19 demonstruje úspěšné aerobní biologické přečištění od benzenu, chlorbenzenu, nitrobenzenu a naftalenu podle TCLP. Díky stripování bylo odstraněno 30 až 60 % chlorbenzenu a 10 až 30 % benzenu, ale méně než 17 % nitrobenzenu. To znamená, že hlavním způsobem odstranění těchto sloučenin je bakteriální aerobní degradace těchto sloučenin.

01.04.98

Tabulka 19

Dehtovitý kal

Podmínky: zaočkováno, 30 až 35 % vlhkosti, 0,25 slpm
průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem) *		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	553,0	< 10	< 0,5	---	11,3
chlorbenzen	3528,0	38,0	< 1	1,1	80,8
nitrobenzen	5752,0	85,0	< 2	1,5	7,8
naftalen	17670,0	357,0	< 1	2,0	3,0

Dehtovitý kal

Podmínky: zaočkováno, 30 až 35 % vlhkosti, 0,25 slpm průtok
vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem) *		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	643,0	< 10	< 0,5	---	35,2
chlorbenzen	3905,0	644,0	< 1	16,5	34,5
nitrobenzen	6065,0	1587,0	< 2	26,2	0,5
naftalen	16980,0	6110,0	< 1	36,0	0,2

* TCL

9.7 Degradace v pevné fázi podobná kompostování: příklad 6

U neelastomerního kalu byl zvětšen objem pomocí pilin
(20 % hmotn./hmotn.), jak je popsáno výše. Zbytnělý kal,

který měl alkalické pH, byl neutralizován pomocí kyseliny sírové. Neutralizovaný a zbytnělý kal byl umístěn v nádrži, zaočkován kapalnou směsnou kulturou a zpracováván po dobu 14 dnů. Tabulka 20 ukazuje dvě úspěšná individuální biologická zpracování stejného výchozího materiálu.

Tabulka 20

Kal

Podmínky: bez úpravy pH, nezaočkováno, 50 až 55 % vlhkosti, 250 slpm průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem)*		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	1972,0	61,0	nest. **	3,1	88,3
chlorbenzen	29,0	< 10		---	81,4
nitrobenzen	< 10	< 10		---	---
naftalen	< 10	< 10		---	---

Kal

Podmínky: zaočkováno, 50 až 55 % vlhkosti, 250 slpm průtok vzduchu

organické sloučeniny	sloučeniny v materiálu (extrakce rozpuštědlem)*		TCLP (kyselá vodná extrakce) (mg/l)	Procentické zastoupení těkavých organických sloučenin	
	původní (ppm)	konečná (ppm)		% zbylé v materiálu	% těk. GAC
benzen	2135,0	55,0	nest. **	10,2	90,1
chlorbenzen	30,0	< 10		---	66,4
nitrobenzen	< 10	< 10		---	---
naftalen	< 10	< 10		---	---

01.04.98

* TCL

** nestanoveno

Významná množství jak benzenu, tak chlorbenzenu byla stripována a jímána v lapači s granulovaným aktivní uhlím (GAC). Během prvních 48 hodin bylo odvedeno stripováním více než 95 % benzenu a 90 % chlorbenzenu. Toto rychlé odstranění bylo následováno pomalým snižováním po zbývajících dobu.

10. Deponování mikroorganismů

Následující mikroorganismy byly deponovány 13. prosince 1994 v Americké typové sbírce kultur (American Type Culture Collection ATCC), Rockville, MD a byla jim přidělena následující depozitní čísla:

Mikroorganismy	ATCC depozitní číslo
Pseudomonas sp. (DAP 70)	55646
Pseudomonas sp. (DAP 111)	55645
Pseudomonas sp. (DAP 622)	55648
Pseudomonas sp. (DAP 631)	55647
Aeromonas sp. (DAP 68)	55642
Aeromonas sp. (DAP 119)	55641
Corynebacterium sp. (DAP 66)	55643
Zoogloea sp. (DAP 73)	55649
směsná kultura mikroorganismů	ATCC depozitní číslo
DAP 2	55644

Následující mikroorganismy byly deponovány 30.
listopad 1995 také u American Type Culture Collection
(ATCC), Rockville, MD, a byla jim předělena následující
depozitní čísla:

Mikroorganismy	ATCC depozitní číslo
DAP 623	55722
DAP 626	55723
DAP 629	55726
DAP 632	55727
DAP 115	55724
DAP 120	55725

Zde popsany a nárokovany vynález není omezen co do
rozsahu zde uvedeným konkrétními provedeními, která jsou
zamýšlena pouze jako ilustrace několika aspektů vynálezu.
Jakákoli ekvivalentní provedení jsou považována za
spadající do rozsahu tohoto vynálezu. Různé modifikace
vynálezu kromě těchto zde popsanych budou zřejmá pro
odborníka v oboru z výše uvedeného popisu. Tyto modifikace
jsou také zamýšleny tak, že spadají do rozsahu dále
uvedených nároků.

Řada dokumentů, jejichž závěry jsou zde citovány, je
zde uvedena jako odkaz.

International Application No: PCT/

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 84, lines 1-25 of the description.

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT '

Further deposits are identified on an additional sheet .

Name of depository institution '

American Type Culture Collection

Address of depositary institution (including postal code and country) *

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

Date of deposit * December 13, 1994 Accession Number * 55646

B. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE * (if the indications are not all designated States)

D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS * (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later * (Specify the general nature of the indications e.g.,
Accession Number of Deposit)

E. ☐ This sheet was received with the International application when filed (to be checked by the receiving Office)

(Authorized Officer)

☐ The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau "

was

(Authorized Officer)

01.04.99

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

Accession No.

Date of Deposit

55645	December 13, 1994
55648	December 13, 1994
55647	December 13, 1994
55642	December 13, 1994
55641	December 13, 1994
55643	December 13, 1994
55649	December 13, 1994
55644	December 13, 1994
55722	November 30, 1995
55723	November 30, 1995
55726	November 30, 1995
55727	November 30, 1995
55724	November 30, 1995
55725	November 30, 1995

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Biologicky čistá kultura mikroorganismů vybraných z následujících kmenů:

Mikroorganismus	ATCC depozitní číslo
Pseudomonas sp. (DAP 70)	55646
Pseudomonas sp. (DAP 111)	55645
Pseudomonas sp. (DAP 622)	55648
Pseudomonas sp. (DAP 631)	55647
Aeromonas sp. (DAP 68)	55642
Aeromonas sp. (DAP 119)	55641
Corynebacterium sp. (DAP 66)	55643
Zoogloea sp. (DAP 73)	55649
Bacteria (DAP 623)	55722
Bacteria (DAP 626)	55723
Bacteria (DAP 115)	55724
Bacteria (DAP 120)	55725
Bacteria (DAP 629)	55726 a
Bacteria (DAP 632)	55727

2. Biologicky smíšená kultura mikroorganismů, DAP 2, mající depozitní číslo ATCC 55644.

3. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 k aerobní degradaci alespoň jedné sloučeniny nebo směsi sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, které zahrnuje uvedení do kontaktu uvedené sloučeniny nebo směsi sloučenin s kulturou mikroorganismů.

01.04.98

4. Použití podle nároku 3, kde sloučenina nebo směs sloučenin je degradována na produkty obsahující oxid uhličitý a vodu.

5. Použití podle nároku 3, kde mikroorganismy mají depozitní číslo ATCC 55644.

6. Způsob podle nároku 3, kde sloučenina nebo směs sloučenin představuje aromatickou, nitroaromatickou, nebo halogenaromatickou sloučeninu nebo jejich směs a mikroroganismus má depozitní číslo ATCC 55644.

7. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je aromatická, nitroaromatická, nebo halogenaromatická sloučenina.

8. Použití podle nároku 3, kde sloučenina nebo směs sloučenin je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorobenzen, fenol, kresol, nitobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, methylnaftalen, methanol, formaldehyd, chloroform, pyren, acenaftylen, fluoranthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthen, dibenzofuran, chrysen, katechol, kyselina m-toluylová, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans-cinnamaldehyd, mesitylen, salicylát, 1,4-dinitrobenzen, chlortoluen, chlorbenzoát, chlornitrobenzen, melamin, kyselina kyanurová, hexadekan, limonen, nebo směs alespoň dvou uvedených sloučenin.

9. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je nitrobenzen a kultura mikroorganismů je vybrána z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

01.04.98

10. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je naftalen, methylnaftalen, chlornaftalen nebo anthracen a mikroorganismus je vybrán ze mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55646, 55649, 55645, 55641 a 55648.

11. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je anilin a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55645, 55641, 55648, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

12. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je vybrána z mesitylenu, limonenu, chlorbenzenu, 2-, 3-, a 4-chlortoluenu, 2-, 3-, a 4-chlorbenzoové kyseliny a 1,3-dichlorbenzenu a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55722, 55723, 55726, 55727 a 55724.

13. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je melamin a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55722, 55723, 55726, 55727 a 55724.

14. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je kyselina kyanuronová a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55645 a 55641.

15. Použití podle nároku 3, ke směs aromatických, nitroaromatických a halogenaromatických sloučenin v celkovém koncentračním rozmezí těchto sloučenin asi 10 ppm až 100 000 ppm je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu během asi 2 až 72 hodin.

01.04.99

16. Použití podle nároku 3, kde sloučenina je uváděna do kontaktu s mikroorganismem v médiu při hodnotě pH mezi asi 3 a 11.
17. Použití podle nároku 16, kde hodnota pH je mezi asi 6 a 8.
18. Použití podle nároku 3, dále zahrnující dodávání kyslíku pomocí přídavku kyslík obsahující nebo kyslík uvolňující kompozice.
19. Použití podle nároku 18, kde kyslík obsahující nebo kyslík uvolňující kompozice je vybrána ze skupiny obsahující vzduch, čistý kyslík, peroxid, jiné peroxidové chemické látky, které uvolňují kyslík a jejich směsi.
20. Použití podle nároku 18, kde kyslík je dodáván tak, že tlak rozpuštěného kyslíku je mezi asi 0,1 % a 100 % saturace.
21. Způsob podle nároku 20, kde tlak rozpuštěného kyslíku je mezi asi 4 % a 80 % saturace.
22. Způsob výroby fluidní kompozice, vhodné pro aerobní reakci, z elastomerních pevných látek nebo kalů, **vyznačující se tím, že zahrnuje:**
- a) partikularizaci elastomerní pevné látky nebo kalu obsahujících organickou sloučeninu; a
 - b) uvedení do kontaktu partikularizované pevné látky nebo kalu s proudem kapaliny vybrané ze skupiny obsahující kyslík, plyn obsahující kyslík, vodu a vodný roztok tak, že

je partikularizovaná pevná látka nebo kal suspendována v proudu tekutiny ve formě fluidní kompozice vhodné pro aerobní reakci organické sloučeniny obsahující pevnou látku nebo kal.

23. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím, že** plynem obsahujícím kyslík je vzduch.

24. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím, že** dále zahrnuje spojení elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování buď současně nebo následně po kroku a).

25. Způsob výroby suspenze z elastomerní pevné látky nebo kalu **vyznačující se tím, že** zahrnuje:

- a) směšování elastomerní pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem;
- b) zavádění energie do uvedené kombinace pevná látka nebo kal/voda tak, že uvedená pevná látka nebo kal je fluidizován na suspenzi; a
- c) oddělení uvedené suspenze od zbytkové pevné látky nebo kalu.

26. Způsob výroby suspenze z elastomerní pevné látky nebo kalu **vyznačující se tím, že** zahrnuje:

- a) směšování elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování za vzniku kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování;
- b) směšování uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování s vodou nebo vodným roztokem; a

c) zavádění energie do vodné směsi uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování tak, že uvedená nelepivá pevná látka nebo kal je fluidizován na suspenzi.

27. Způsob podle nároku 26, **vyznačující se tím, že** dále zahrnuje míchání uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování za vzniku nelepivé pevné látky nebo kalu před krokem b).

28. Způsob podle nároku 26, **vyznačující se tím, že** kroky a) a c) jsou prováděny současně.

29. Způsob podle nároku 24, 26 nebo 28, **vyznačující se tím, že** činidlo proti slepování je vybráno ze skupiny obsahující hlinku, práškovité anorganické soli a kamenný prach.

30. Způsob podle nároku 24, 26 nebo 28, **vyznačující se tím, že** činidlo proti slepování je vybráno ze skupiny zahrnující práškové vápno, portlandský cement, bentonitový jíl, piliny, křemelinu, na prášek rozemleté klasy a jejich směsi.

31. Kompozice, **vyznačující se tím, že** obsahuje suspenzi vyrobenou podle nároku 26 nebo 28.

32. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění suspenze obsahující alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje

01.04.98

a) úpravu pH suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba;
b) kontaktování uvedené neutrální suspenze s kulturou mikroorganismů, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

33. Použití podle nároku 32 dále zahrnující:

c) kultivaci uvedeného mikroorganismu s uvedenou suspenzí tak, že je degradována sloučenina na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

34. Použití podle nároku 33, kde sloučeninou je aromatická, nitroaromatická nebo halogenaromatická sloučenina.

35. Použití podle nároku 32, kde sloučeninou je nitrobenzen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo 55644, 55648, 55645 a 55641.

36. Použití podle nároku 32, kde sloučeninou nebo směsí sloučenin je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, halogennaftalen, methylnaftalen, styren, methanol, formaldehyd nebo chloroform, pyren, acenaftylen, fluoranthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthen, dibenzofuran, chrysen, katechol, kyselina m-toluylová, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans-cinnamaldehyd, mesitylen, salicylát, 1,4-dinitrobenzen, chlortoluen, chlorbenzoát, chlornitrobenzen, melamin, kyselina kyanurová, hexadekan, limonen, nebo směs alespoň dvou uvedených sloučenin.

37. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění ve fluidní fázi pevné látky nebo kalu obsahujícího alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny obsahující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje:

- a) smíchání uvedené pevné látky nebo kalu s vodou nebo vodným roztokem;
- b) zavedení energie do uvedené kombinace pevná látka nebo kal/voda tak, že uvedená pevná látka nebo kal je fluidizován na suspenzi;
- c) úpravu pH uvedené suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a
- d) kontaktování uvedené neutrální suspenze s kulturou mikroorganismů, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

38. Použití podle nároku 37, které dále zahrnuje:

- e) kultivaci uvedeného mikroorganismu s uvedenou suspenzí tak, že sloučenina nebo směs sloučenin je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

39. Použití podle nároku 37, kde pevná látka nebo kal je elastomerní pevná látka nebo kal, a které dále zahrnuje: oddělení uvedené suspenze od zbývajících elastomerní pevné látky nebo kalu před krokem c).

40. Použití podle nároku 39 dále zahrnující postupné přidávání reziduální pevné látky nebo kalu k neutrální

suspenzi kontaktované s uvedenými mikroorganismy v kroku d).

41. Použití podle nároku 37, kde sloučenina nebo směs je aromatická, nitroaromatická, halogennitroaromatická nebo halogenaromatická sloučenina nebo jejich směs.

42. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění ve fluidní fázi elastomeních pevných látek nebo usazenin obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje:

- a) smíchání uvedené elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování;
- b) smísení uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování s vodou nebo vodným roztokem;
- c) dodávání energie do uvedené vodné kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování tak, že uvedená nelepivá pevná látka nebo kal je fluidizován za vzniku suspenze;
- d) úpravu pH uvedené suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba;
- e) kontaktování uvedené neutrální suspenze s kulturou mikroorganismů, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

43. Použití podle nároku 42 dále zahrnující před krokem b) mísení uvedené kombinace pevná látka nebo kal/činidlo proti slepování za vzniku nelepivé pevné látky nebo kalu.

01.04.98

44. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění ve fluidní fázi elastomerních pevných látek nebo kalů obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje:

- a) smíchání elastomerní pevné látky nebo kalu s činidlem proti slepování a s vodou nebo vodným roztokem za vzniku směsi;
- b) zavedení energie do uvedené směsi vytvořené v kroku a) tak, že uvedená elastomerní pevná látka nebo kal je fluidizován na suspenzi;
- c) úpravu pH uvedené suspenze k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a
- d) kontaktování uvedené neutrální suspenze s kulturou mikroorganismů, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

45. Použití podle nároku 40 dále zahrnující:

- e) kultivaci uvedeného mikroorganismu s uvedenou suspenzí tak, že sloučenina nebo směs sloučenin je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

46. Použití podle nároku 44, kde sloučenina nebo směs je aromatická, nitroaromatická nebo halogenaromatická sloučenina nebo jejích směs.

01.04.98

47. Použití podle nároku 42 nebo 44, kde činidlo proti slepování je vybráno ze skupiny obsahující jíly, práškové anorganické soli a kamenný prach.

48. Použití podle nároku 42 nebo 44, kde činidlo proti slepování je vybráno ze skupiny sestávající z práškového vápna, portlandského cementu, bentonitové hlíny, pilin, křemeliny, na prášek rozemletých klasů a jejich směsí.

49. Použití podle nároku 37, 42 nebo 44, kde sloučenina nebo směs sloučenin je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen, fenol, kresol, nitobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogénnaftalen, methylnaftalen, methanol, formaldehyd nebo chloroform nebo jejich směs.

50. Použití podle nároku 32, 37, 42 nebo 44, dále zahrnující monitorování mizení uvedené sloučeniny nebo směsi sloučenin z uvedené suspenze.

51. Použití podle nároku 32, 37, 42 nebo 44 dále zahrnující dodávání kyslíku přísadkou kyslík obsahující nebo kyslík uvolňující kompozice.

52. Způsob podle nároku 51, kde kyslík obsahující nebo uvolňující kompozice je vybrána ze skupiny obsahující vzduch, čistý kyslík, peroxid, jiné peroxy chemikálie, které uvolňují kyslík, a jejich směsí.

53. Způsob podle nároku 51, kde tlak rozpuštěného kyslíku je mezi asi 0,1 % a 100 % saturace.

54. Způsob podle nároku 53, kde tlak rozpuštěného kyslíku je mezi asi 4 % a 80 % saturace.

55. Použití podle nároku 33, 38 nebo 45, kde kultivace probíhá v přítomnosti uhlíku, dusíku a fosforu v poměru mezi asi 10 : 1 : 0,1 a asi 50 : 1 : 1.

56. Použití podle nároku 55, kde poměr je asi 25 : 1 : 0,1.

57. Použití podle nároku 42, 43, 44 nebo 47, kde činidla proti slepování je asi 2 až 100 % hmotn. původní pevné látky nebo kalu.

58. Způsob podle nároku 32, 37, 42 nebo 44, kde suspenze je mezi asi 20 až 100 % hmotn. původní pevné látky nebo kalu.

59. Způsob podle nároku 58, kde suspenze je mezi asi 62 až 100 % hmotn. původní pevné látky nebo kalu.

60. Způsob podle nároku 32, 37, 42 nebo 44, kde proces biologického čištění je prováněn vsádkovým způsobem, sekvenčním vsádkovým způsobem nebo kontinuálním způsobem.

61. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění v pevné fázi pevných látek, kalů nebo půd obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje:

01.04.98

- a) směšování uvedené pevné látky, kalu nebo půdy s objemovým činidlem tak, že tekutina může snadno procházet nabytou směsí;
- b) úpravu pH nabyté směsi k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a
- c) kontaktování uvedené nabyté směsi s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55724, 55725, 55727, 55726 a 55727.

62. Použití podle nároku 62 dále zahrnující:

- d) kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou nabytou pevnou látkou, kalem nebo půdou tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

63. Použití podle nároku 61, kde mikroorganismus má depozitní číslo ATCC 55644.

64. Použití podle nároku 61, kde sloučenina nebo směs sloučenin je aromatická, nitroaromatická nebo halogenaromatická sloučenina nebo jejich směs.

65. Použití podle nároku 62, kde sloučeninou nebo směsí sloučenin je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, methylnaftalen, methanol, formaldehyd, chloroform, pyren, acenaftylen, fluroanthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthren, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylová kyselina, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans-aldehyd kyseliny skořicové, mesitylen, salicylát, 1,4-dinitrobenzen,

chlortoluen, chlorbenzoát, chlornitrobenzen, melamin, kyanuronová kyselina, hexadekan, limonen nebo jejich směs.

66. Použití podle nároku 61, kde sloučeninou je nitrobenzen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismu mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645 a 55641.

67. Použití podle nároku 61, kde sloučeninou je naftalen, methylnaftalen, chlornaftalen nebo anthracen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55646, 55649 a 55645.

68. Použití podle nároku 61, kde sloučeninou je anilin a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55645, 55641 a 55648.

69. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění v pevné fázi dehtovitých a/nebo elastomerních pevných látek, kalů nebo půd obsahujících alespoň jednu sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje:

a) smísení dehtovité nebo elastomerní pevné látky, dehtovitého nebo elastomerního kalu nebo dehtovité nebo elastomerní půdy s činidlem proti slepování tak, že uvedená pevná látka, půda nebo kal tvoří partikularizovanou směs, která je méně dehtovitá a/nebo elastomerní;

b) úpravu pH uvedené směsi k neutrálnímu pH, pokud je to třeba; a

01.04.98

c) kontaktování uvedené směsi s mikroorganismy, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy mající depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

70. Použití podle nároku 69, které dále zahrnuje:

d) kultivaci uvedených mikroorganismů s uvedenou sloučeninou nebo směsí sloučenin tak, že uvedená sloučenina je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

71. Použití podle nároku 69, které dále zahrnuje smísení partikularizované dehtovité nebo elastomerní pevné látky, dehtovitého nebo elastomerního kalu nebo dehtovité nebo elastomerní půdy s objemovým činidlem buď současně nebo následně po kroku a).

72. Použití podle nároku 69, kde mikroorganismus má depozitní číslo ATCC 55644.

73. Použití podle nároku 69, kde sloučenina nebo směs je aromatická, nitroaromatická, nebo halogenaromatická sloučenina nebo směs uvedených sloučenin.

74. Použití podle nároku 69, kde sloučenina nebo směs je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, methylnaftalen, methanol, formaldehyd, chloroform, pyren, acenaftylen, fluroanthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthén, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylová kyselina,

01.04.98

acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans- aldehyd kyseliny skořicové, mesitylen, salicylát, 1,4-dinitrobenzen, chlortoluen, chlorbenzoát, chloronitrobenzen, melamin, kyanuronová kyselina, hexadekan, limonen nebo směs alespoň dvou uvedených sloučenin.

75. Použití podle nároku 69, kde sloučeninou je nitrobenzen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645 a 55641.

76. Použití podle nároku 69, kde sloučeninou je naftalen, methylnaftalen, chlornaftalen nebo anthracen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55646, 55649 a 55645.

77. Použití podle nároku 69, kde sloučeninou je anilin a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55645, 55641 a 55648.

78. Použití podle nároku 61 nebo 71, kde objemové činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující sekané organické materiály a anorganické soli.

79. Použití podle nároku 61 nebo 71, kde objemové činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující dřevěné odštěpky, piliny, klasy a jejich směsi.

80. Použití podle nároku 69, kde činidlo proti slepování je vybráno ze skupiny zahrnující práškové vápno, portlandský cement, bentonitový jíl, infuzoriovou hlinku, piliny, práškové klasy a jejich směsi.

01.04.98

81. Použití podle nároků 61 nebo 71, které dále zahrnuje:

d) monitorování mizení sloučeniny nebo směsi sloučenin z uvedené nabyté směsi.

82. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění odpadních materiálů obsahujících alespoň jednu sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje:

a) smíchání činidla schopného chemicky konvertovat silně halogenované organické sloučeniny, silně nitrované organické sloučeniny nebo silně nitrované a zesíťované polymerní sloučeniny v odpadním materiálu na monomerní sloučeniny za vzniku předzpracované kompozice; a
b) kontaktování uvedené předzpracované kompozice s kulturou mikroorganismů, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členy skupiny zahrnující mikroorganismy, které mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

83. Použití podle nároku 82 dále zahrnující:

c) kultivaci uvedených mikroorganismů tak, že uvedená sloučenina nebo směs sloučenin je degradována na produkty zahrnující oxid uhličitý a vodu.

84. Použití podle nároku 82, kde mikroorganismy mají depozitní číslo 55644.

85. Použití podle nároku 82, kde sloučenina nebo směs sloučenin je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen,

01.04.98

chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, methylnaftalen, methanol, formaldehyd, chloroform, pyren, acenaftylen, fluroanthen, fenanthren, benzo-(b)-fluoranthren, dibenzofuran, chrysen, katechol, m-toluylová kyselina, acetát kyseliny skořicové, vanilin, trans- aldehyd kyseliny skořicové, mesitylen, salicylát, 1,4-dinitrobenzen, chlortoluen, chlorbenzoát, chloronitrobenzen, melamin, kyanuronová kyselina, hexadekan, limonen nebo jejich směs.

86. Způsob podle nároku 82, kde sloučeninou je nitrobenzen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645 a 55641.

87. Způsob podle nároku 82, kde sloučeninou je naftalen, methylnaftalen, chlornaftalen nebo anthracen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55646, 55649 a 55645.

88. Způsob podle nároku 82, kde sloučeninou je anilin a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55645, 55641 a 55648.

89. Použití podle nároku 82, kde činidlem je Fentonovo činidlo nebo kovové železo.

90. Biofiltr **vyznačující se tím, že** obsahuje zařízení mající kulturu mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 imobilizovanou na pevném nosiči, přičemž uvedené mikroorganismy jsou členem skupiny zahrnující mikroorganismy, které mají depozitní číslo ATCC 55644,

55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

91. Použití kultury mikroorganismů podle nároku 1 nebo 2 při způsobu biologického čištění odpadních vod obsahujících sloučeninu nebo směs sloučenin vybraných ze skupiny zahrnujících aromatické, nitroaromatické, halogenaromatické, halogennitroaromatické, alifatické a halogenalifatické sloučeniny, který zahrnuje průtok uvedených odpadních vod přes biofiltr, který obsahuje zařízení mající mikroorganismy imobilizované na pevném nosiči, přičemž uvedené mikroorganismy mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645, 55641, 55647, 55642, 55643, 55646, 55649, 55722, 55723, 55724, 55725, 55726 a 55727.

92. Použití podle nároku 91, kde mikroorganismy mají depozitní číslo ATCC 55644.

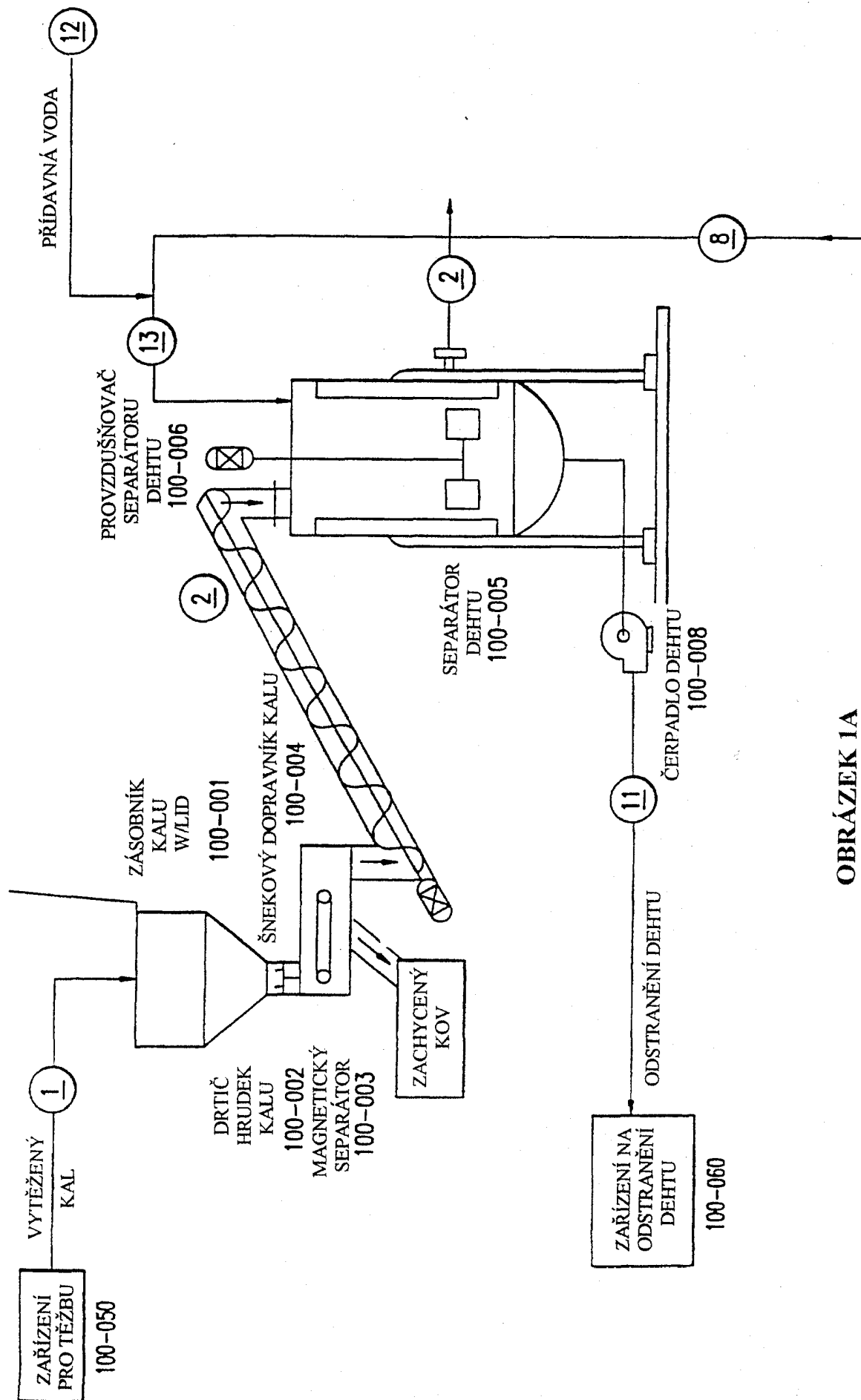
93. Použití podle nároku 91, kde sloučeninou je benzen, toluen, xylen, ethylbenzen, naftalen, chlorbenzen, fenol, kresol, nitrobenzen, anilin, anthracen, dimethylfenol, styren, halogennaftalen, methylnaftalen, methanol, formaldehyd nebo chloroform.

94. Použití podle nároku 91, kde sloučeninou je nitrobenzen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů, které mají depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55645 a 55641.

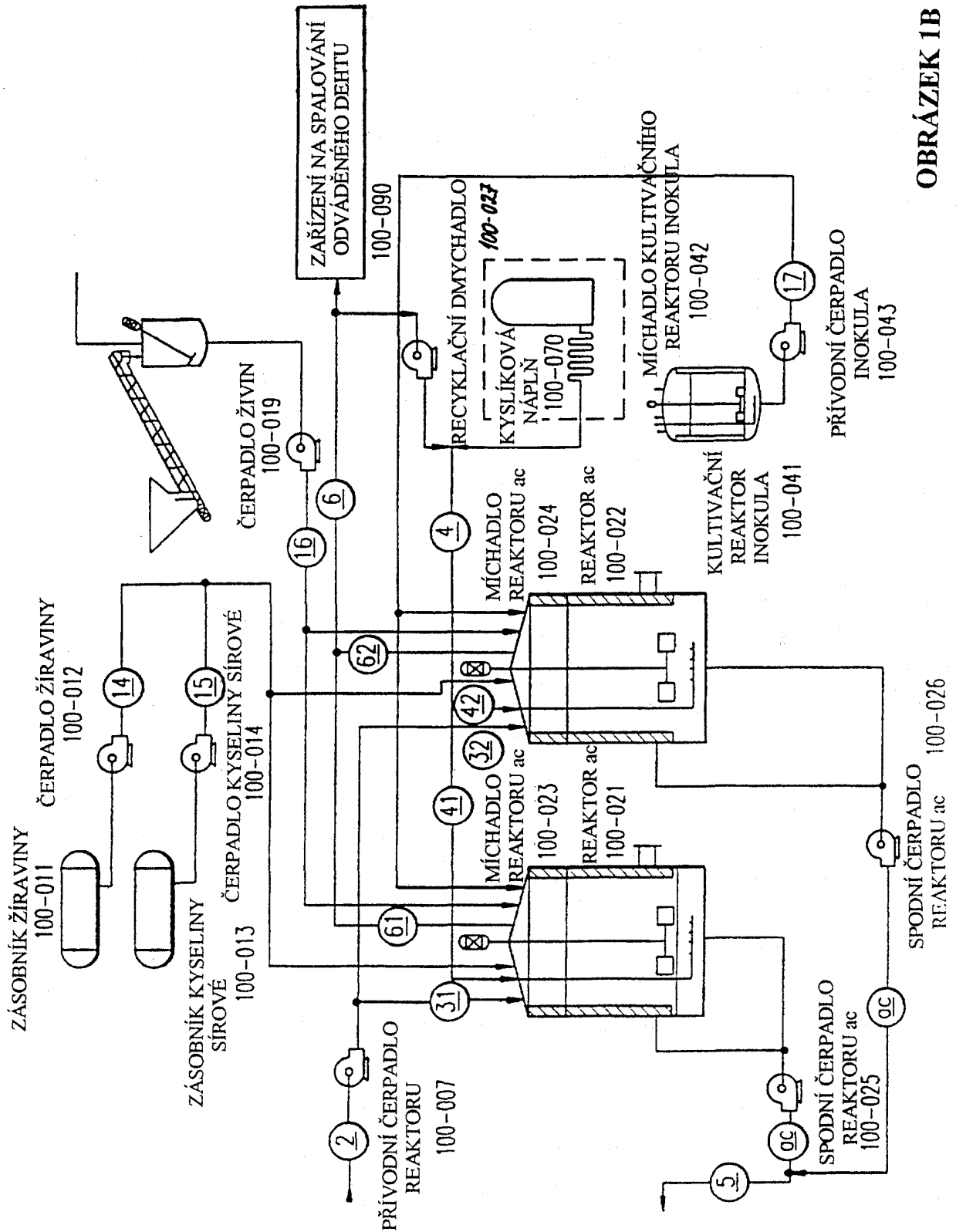
95. Použití podle nároku 91, kde sloučeninou je naftalen, methylnaftalen, chlornaftalen nebo anthracen a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55648, 55646, 55649 a 55645.

01.04.98

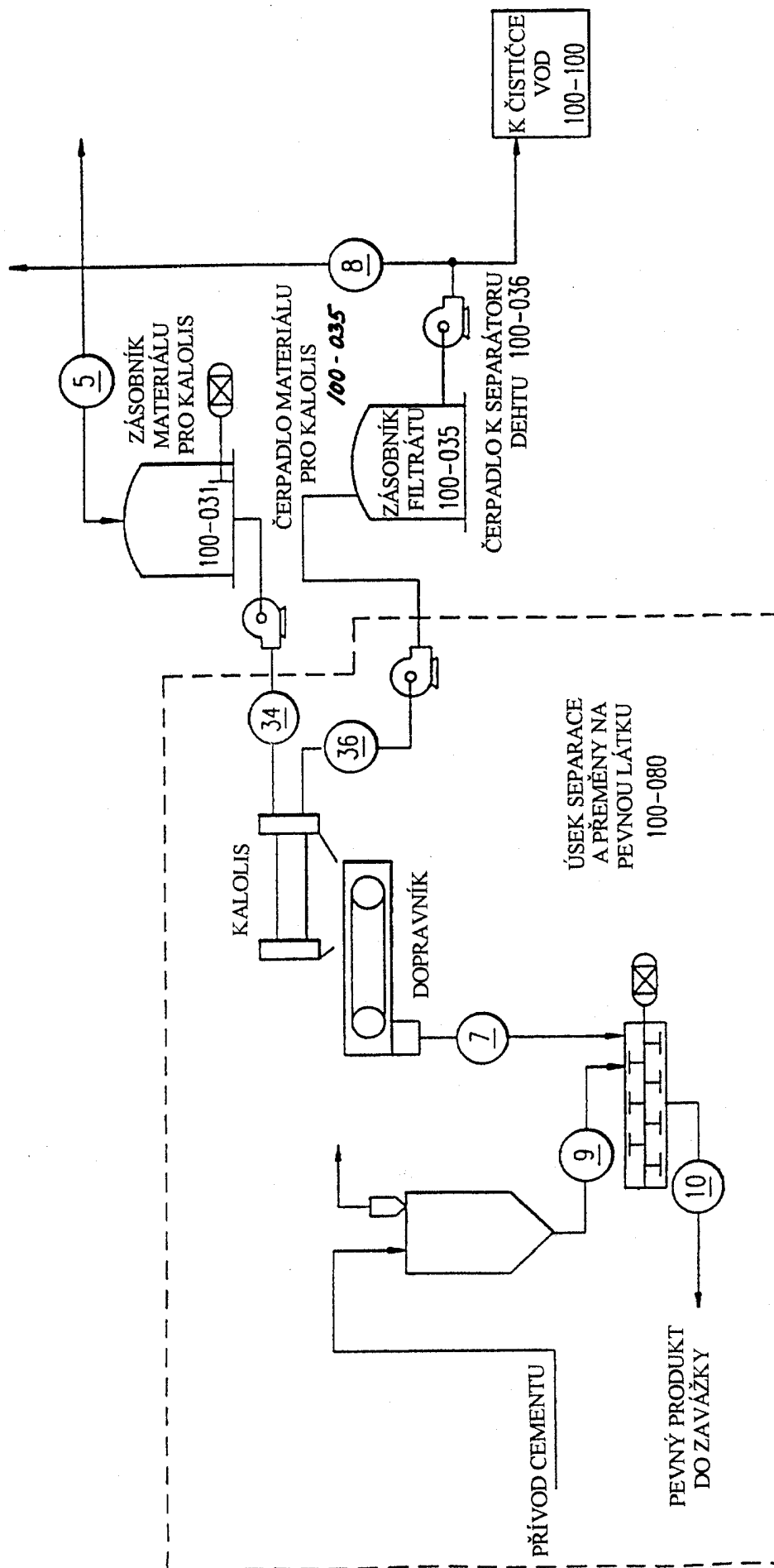
96. Použití podle nároku 91, kde sloučeninou je anilin a mikroorganismus je vybrán z mikroorganismů majících depozitní číslo ATCC 55644, 55645, 55641 a 55648.



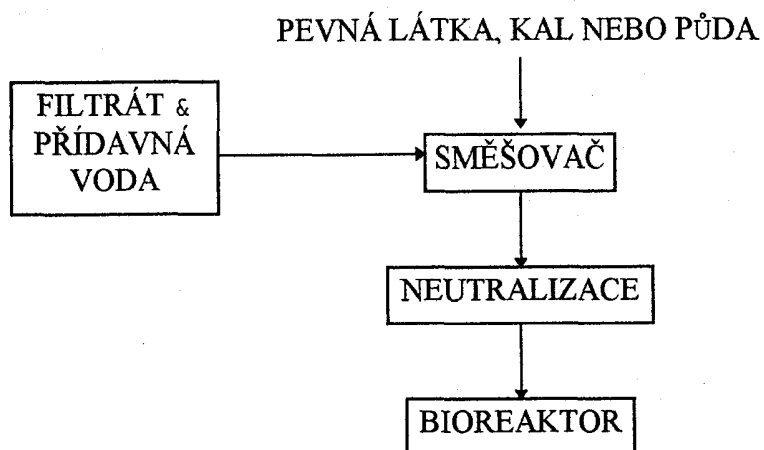
OBRÁZEK 1A



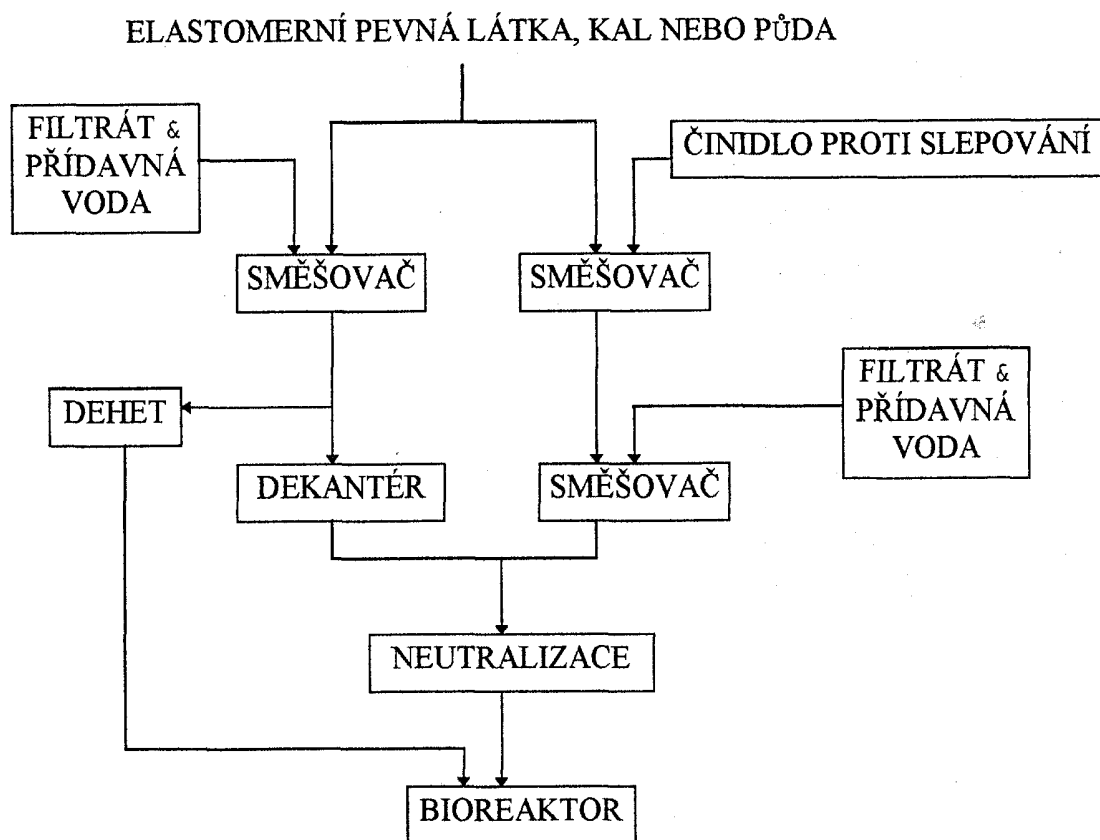
OBRÁZEK 1B



OBRÁZEK 1C



OBRÁZEK 2A

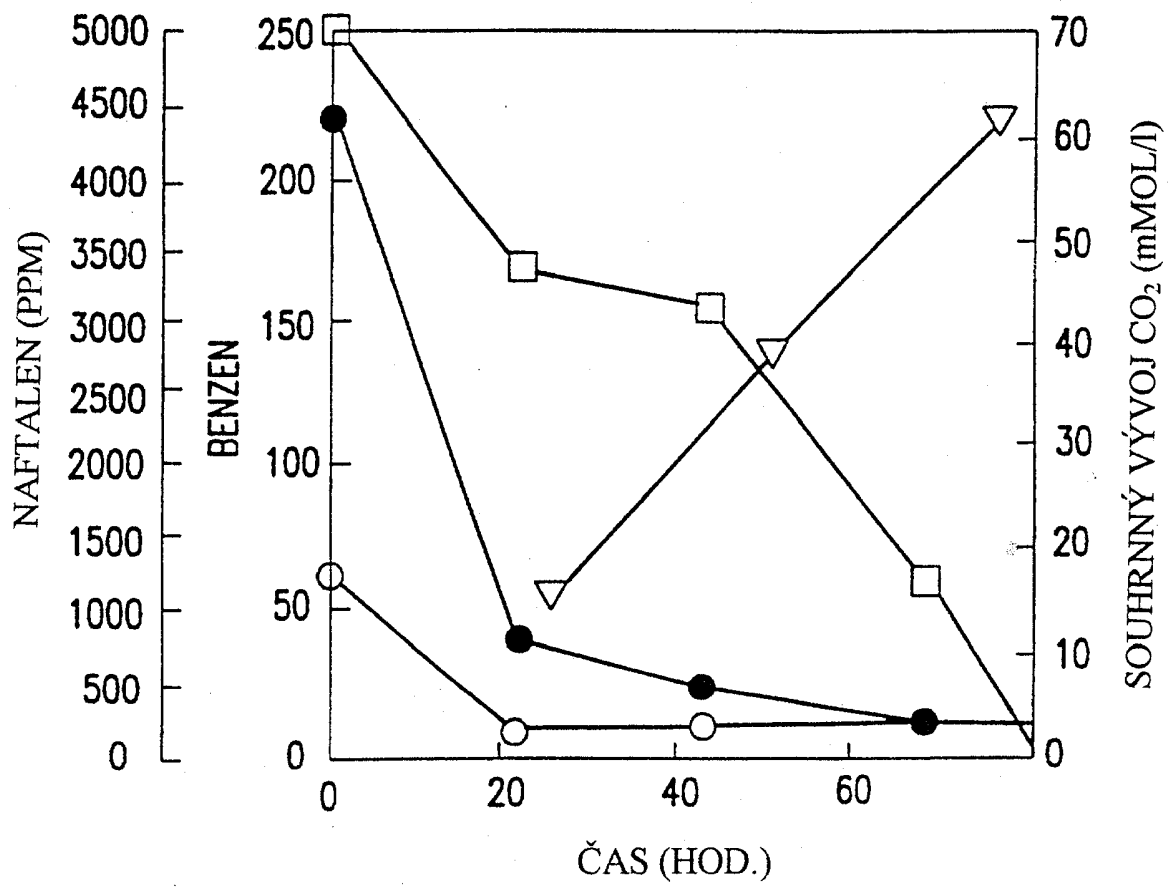


OBRÁZEK 2B

5/7

PV 1838-99

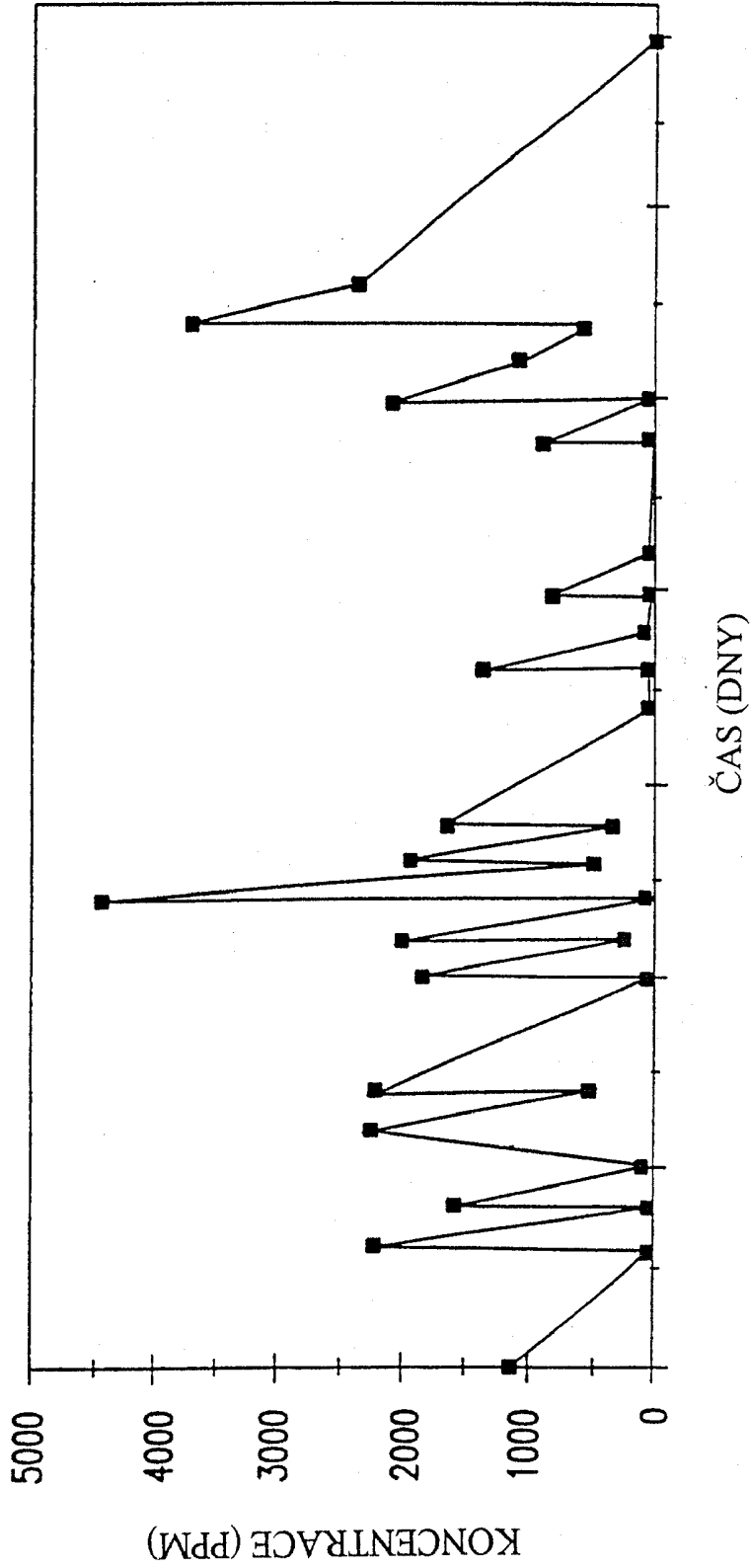
01.04.99



OBRÁZEK 3

01.04.98

6/7

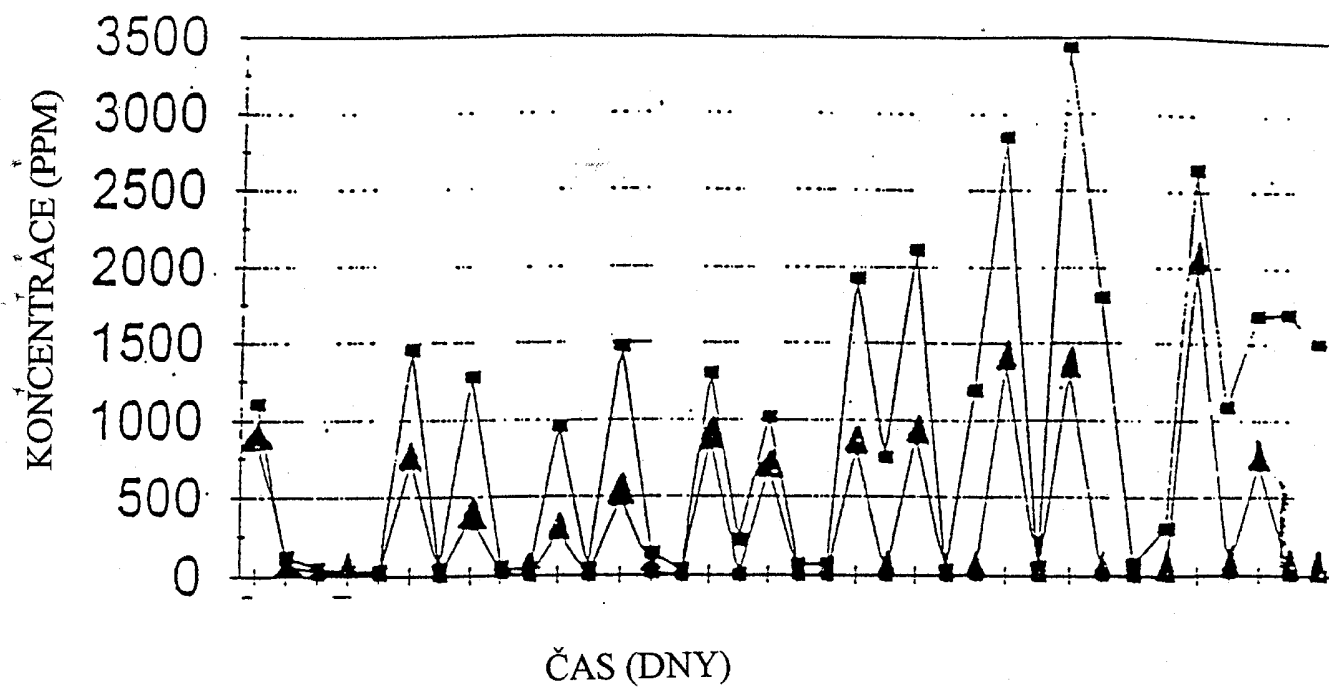


OBRÁZEK 4

4/4

PV 1838-97

01.04.98



OBRÁZEK 5