



(10) **DE 198 80 157 B4** 2013.04.11

(12)

Patentschrift

(21) Deutsches Aktenzeichen: **198 80 157.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SK98/00003**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/037038**
(86) PCT-Anmeldetag: **19.02.1998**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **27.08.1998**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **11.04.2013**

(51) Int Cl.: **C12N 1/20 (2006.01)**
C05F 11/08 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität:
PV 250-97 25.02.1997 SK

(73) Patentinhaber:
Pollák, Arpád, Velký Meder, SK

(74) Vertreter:
**Jeck · Fleck · Herrmann Patentanwälte, 71665,
Vaihingen, DE**

(72) Erfinder:
gleich Patentinhaber

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

**BIOSIS-Abstract:1993:101544 SINGH,
C.S.: Mass inoculum production of vesicular-
arbuscular (VA) mycorrhizae: II. Impact of
nitrogen-fixing and phosphorus-solubilizing
bacterial inoculation on VA-mycorrhiza.
Zentralblatt für Mikrobiologie (1992) 147 (8) 503-
508**

**CABA-Abstract:90:65633 FAYEZ, M.:
Untraditional N₂-fixing bacteria as biofertilizers
for wheat and barley. Annals of Agricultural
Science (1989) 34 (2) 731-740**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Vorbereitung einer Mikroorganismenmischung zur Bindung von
atmosphärischem Stickstoff, zur Erhöhung der Löslichkeit von Phosphorverbindungen und zur Zersetzung
von Lebensmittelsediment und die genannte Mischung**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Mischungsvorbereitung zur Stickstoffbindung aus der Luft, zur Erhöhung der Löslichkeit von Phosphorverbindungen und zur Zersetzung von Lebensmittelsediment und die genannte Mischung selbst. Gemäß der Erfindung werden durch gemeinsame Fermentation von mindestens zwei Mikroorganismenstämmen in einem nicht stickstoffhaltigen Nährboden mit einem Inhalt von Phosphorverbindungen die Bakterienstämme *Azotobacter chroococcum* CCM 4642 und *Azospirillum brasilense* CCM 4644 während 22 Stunden bei einer Temperatur von 28°C vermehrt, dann werden zu diesen Bakterienstämmen der Bakterienstamm *Bacillus megatherium* CCM 4643 und der Bakterienstamm *Pseudomonas putida* CCM 4641 zugegeben und alle diese Bakterienstämme werden gemeinsam 44 bis 46 Stunden bei einer Temperatur von 28°C und bei einer Belüftung mit 0,6 Liter Luft/1 Liter des Nährbodens kultiviert.

Beschreibung

Erfindungsgebiet

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbereitung einer Mikroorganismenmischung zur bakteriellen Bindung von atmosphärischem Stickstoff, zur Erhöhung der Löslichkeit von im Wasser unlöslichen Phosphor, der im Erdboden enthalten ist, und zur bakteriellen Zersetzung des bei der Herstellung von Speiseölen anfallenden, unbearbeitbaren Schlammes im Öl, und die genannte Mischung. Die Erfindung ist für den Umweltschutz wegen der Wirkung der Mikroorganismenmetabiose von Bedeutung.

Stand der Technik

[0002] In den letzten Jahrzehnten wurden in der landwirtschaftlichen Produktion überwiegend stickstoffhaltige Kunstdünger verwendet. Dabei wurden hohe Erträge erzielt. Die ständige Anwendung von Kunstdüngern ohne gemeinsame Verwendung von Stalldung verursachte, dass der Erdboden durch hohe Chemikaliengaben sauer wurde und das mikrobielle Leben im Erdboden unterdrückt wurde, dass sich der Erdboden verdichtet hat und dass sich die Wasser- und Luftbedingungen des Erdbodens verschlechtern haben. Außerdem ist schädliches Nitrat in das Grundwasser eingedrungen. Bei starkem Regen hat das Regenwasser den granulierten Kunstdünger in Bäche weggeschwemmt, und so ist das Nitrat auch in die Flüsse gelangt. Durch eine einmalige Gabe größerer Mengen des stickstoffhaltigen Kunstdüngers haben die Pflanzen, vor allem Gartenpflanzen, eine Überdosis von Stickstoff aufgenommen, der eine schädliche Wirkung vor allem auf Säuglinge und Kleinkinder hat, da er im Blut die Methemoglobinose verursacht, die auch tödlich sein kann. Deshalb wurde die Überwachung des Nitratgehalts vor allem bei Gemüse veranlasst, und es wurde eine zulässige Obergrenze festgelegt. In der Praxis ist die ständige Nitratüberwachung in gewünschtem Maß sehr schwer durchführbar.

[0003] Deshalb tritt immer mehr die praktische Möglichkeit der bakteriellen Bindung von atmosphärischem Stickstoff in den Vordergrund. Unterstützend wirkt auch das Problem des Preisanstiegs von stickstoffhaltigem Kunstdünger aufgrund der Preiserhöhung der Energie, da die Produktion der stickstoffhaltigen Kunstdünger einen hohen Energiebedarf erfordert. Nach der Entdeckung der bakteriellen Bindung von atmosphärischem Stickstoff werden, vor allem in letzter Zeit, die Bestrebungen zur Nutzung von atmosphärischem Stickstoff in großem Ausmaß in der Erdbodenwirtschaft in der Landwirtschaftspraxis erhöht.

[0004] Die Stickstoffbindung durch Bakterien des Stamms *Rhizobium* ist bekannt, die auf Wurzeln von Wickenpflanzen, wie z. B. Bohne, Soja, Klee, Knollen

bilden, die atmosphärischen Stickstoff binden. Diese Bindung des Stickstoffs ist aber nur auf Wickenpflanzen (Schmetterlingsblütler) begrenzt.

[0005] Weiterhin sind Verfahren zur Gemischvorbereitung bekannt, die Mikroorganismen zur Erdbodenaufbereitung verwenden. Beispielsweise wird in der russischen Patentschrift RU 2072756 C1 ein Rekultivierungsverfahren für durch Kohleabbau beschädigten Boden beschrieben. Das Wesentliche dieses Verfahrens liegt in der mechanischen Bodenbearbeitung mit nachfolgender Sameneinsaat, die mit Mikroorganismen geimpft ist, oder es wird bei Bedarf in sehr saurem Boden zusätzlich ein anderer Mikroorganismus zugegeben. Diese bekannte Erfindung löst weder das Verfahren der Gemischvorbereitung durch gemeinsame Fermentation, noch regt sie die Herstellung der genannten Mischung an.

[0006] In weiteren veröffentlichten Artikeln, die sich mit der genannten Problematik befassen, sind weitere Verfahren zur Mikroorganismenanwendung beschrieben. Beispielsweise wird in der Zeitschrift *Chemical Abstract*, Vol. 124, Nr. 2, Columbus Ohio, US-Nr. 147114 ein Verfahren zur biologischen Entfernung von einem in Form eines Benzin-, Diesel- und Schmierölgemischs im Wasser enthaltenen Erdöl-kohlenwasserstoff offenbart. Im Wesentlichen handelt es sich um eine Grund- und Abwasserregenerierung. Eine weitere Veröffentlichung in der Zeitschrift *Compendex Engineering Information*, US, Biol. Wastes, 1987, informiert über den Einfluß einer nichtsymbiotischen Stickstoffbindung an organische Abfälle bei Mitwirkung eines Mikroorganismus. Die zitierten Quellen lösen weder das Verfahren zur Vorbereitung des Mikroorganismengemischs noch die damit hergestellte Mischung.

[0007] Eine andere bekannte Lösung nach der Patentschrift HU 207751 B beseitigt teilweise die dem Erdboden zugeführten, anorganischen, nitrat- und phosphathaltigen Kunstdünger; diese Erfindung löst jedoch die Kaliumrückgabe nicht. Ein weiterer Nachteil dieser Mischung ist deren bis 28°C temperaturbegrenzte Wirksamkeit; deswegen wirkt diese Mischung nur in der kurzen Frühlingszeit.

[0008] In der veröffentlichten Patentanmeldung WO 96/34840 A1 ist die Anwendung von neuen stickstoffbindenden Bakterienstämmen mit erhöhter Alkalibeständigkeit und eine zwei-Bakterien-Mischung in wässriger Lösung mit einem Gehalt an Zusätzen und Mikroelementen beschrieben und beansprucht. Der Nachteil dieser Mischung ist die Anwendungsbegrenzung, da die Anwendung bevorzugt nur auf Erdböden mit hohem pH-Wert begrenzt ist.

[0009] Im Patent US 4 952 229 A wird die Anwendung bestimmter Bodenbakterien und stickstoffbindender Bakterien mit einem Zusatz an Mikroelementen

ten, z. B. in Form von Chelat, und verschiedenen Mineralen beschrieben. Der Gegenstand der Erfindung ist der Zusatz und ein Verfahren zur Erhöhung der Fruchtbarkeit und der Pflanzenqualität für die Anwendung im Erdboden oder an Pflanzenblättern. Der Zusatz enthält spezifische Mikroorganismen und eine organische Säure, wie Huminsäure, Fulminsäure und Ulvinsäure, und es können Spurenminerale oder ein Feuchtigkeitsstabilisator zugegeben werden. Im Wesentlichen handelt es sich um die Festlegung der Art der Zusatzauswahl und der Art der Zusatzanwendung bei verschiedenen Pflanzenarten. Diese bekannte Erfindung befasst sich nicht mit einem Verfahren zur Vorbereitung (Herstellung) einer Mikroorganismenmischung durch gemeinsame Fermentation von Mikroorganismen ohne Mineralien oder stickstoffhaltige Mikroelemente, wobei keine Anwendung den wichtigen Bakterienstamm *Bacillus megatherium* beinhaltet. Der Nachteil ist, dass diese bekannte Erfindung eine große Menge an Mineralien und Mikroelementen beansprucht.

Kurzfassung der Erfindung

[0010] Die oben angegebenen Nachteile werden im Wesentlichen durch die im Folgenden beschriebene Erfindung vermieden, deren Ziel die Vorbereitung einer solchen Mischung ist, die den Erdboden fruchtbar macht, den Erdboden mit Stickstoff aus der Luft anreichert, gleichzeitig den unlöslichen Phosphor im Erdboden in eine lösliche Phosphorform umwandelt und das bei der Speiseölherstellung als Abfall anfallende und die Umwelt schädigende Ölsediment verwertet und als Qualitätsdünger für Pflanzennahrung entsorgt. Die Erfindung basiert auf der unerwarteten Entdeckung, dass bei der gemeinsamen Fermentation der Mikroorganismen ohne Gehalt an Mineralien und stickstoffhaltigen Mikroelementen bei bestimmten, genau festgelegten Bedingungen eine Gemischbildung erreicht wird, die nach der Anwendung im Bodensystem für Pflanzen eine Stickstoffbindung aus der Luft gewährleistet und gleichzeitig die unlösliche Phosphorform in eine lösliche Phosphorverbindung umwandelt, wobei eine Zersetzung des Ölsediments aus der Lebensmittelindustrie gesichert wird, wobei dies alles durch einzige Anwendung erfolgt und diese Mischung aktiv in einem breiten Temperaturbereich bis 36–38°C wirkt, also im ganzen Zeitraum der Vegetation.

[0011] Die Grundlage des Verfahrens zur Vorbereitung einer stickstoffbindenden Mischung nach der Erfindung liegt in der Nutzungsart einiger Bakterienstämme *Azotobacter*, die den atmosphärischen Stickstoff dadurch binden, dass sie während ihrer Lebensdauer bei der Vermehrung im Boden die durch sie synthetisierten Stickstoffformen, wie Nitrate, Nitrite, Ammonium, Aminosäuren, Eiweißstoffe, mit kleinen Molekülen in den Boden ausdiffundieren. Diese Stickstoffformen binden sich an die organische Bo-

denmasse, aus der sie durch die Pflanzenwurzel eingesogen werden. Die so kontinuierlich entstehenden Stickstoffverbindungen werden aus dem Boden nicht ausgewaschen und verunreinigen die Umwelt nicht. Ein großer Vorteil ist die kontinuierliche und harmonische Zufuhr des Stickstoffs zu den Pflanzen während des vegetativen Zeitraums der Pflanzen. Bevorzugt wird der Bakterienstamm *Azotobacter chroococcum* CCM 4642 und der Bakterienstamm *Azospirillum brasilense* CCM 464 verwendet. Diese Bakterienstämme wurden in der authentisierten Tschechischen Mikroorganismensammlung, Brno, Tvrdého Nr. 14 unter den oben angegebenen Nummern deponiert.

[0012] Der Bakterienstamm *Azotobacter chroococcum* vermehrt sich am besten bei Temperaturen von 16–30°C, während der Bakterienstamm *Azospirillum brasilense* ein Temperaturoptimum von 24–38°C hat. Mit diesen beiden Bakterienstämmen wird der Erdboden geimpft, dann werden diese Stämme im Boden kultiviert, der im Frühling auf 16°C und im Sommer auf 38°C aufgewärmt ist. Damit werden die Pflanzen mit Stickstoff harmonisch versorgt.

[0013] Ferner haben sich im Boden aufgrund der übermäßigen Anwendung von phosphorhaltigen Kunstdünger sehr große Mengen an Phosphorverbindungen gesammelt, die im Wasser unlöslich und für den Phosphor benötigende Pflanzen deshalb nicht benutzbar sind. Die Mikroorganismen des Stamms *Bacillus megatherium* CCM 4643, der in der authentisierten Tschechischen Mikroorganismensammlung, Brno, Tvrdého Nr. 14 unter der oben angegebenen Nummer deponiert ist, besitzt bei großen Molekülen der Phosphorverbindungen die Fähigkeit, bei seinem energetischen Metabolismus die im Wasser unlöslichen Phosphorverbindungen in in Wasser lösliche Verbindungen umzuwandeln und damit den Boden mit für Pflanzen benutzbaren, löslichen Phosphorverbindungen zu versorgen.

[0014] Durch Impfung des Bodens mit stickstoffbindenden Mikroorganismenstämmen und gleichzeitig mit Mikroorganismenstämmen, die unlösliche Phosphorverbindungen zersetzen, entsteht die sogenannte Metabiose, in der die Stickstoffbinder den nötigen Stickstoff fördern und der Mikroorganismus *Bacillus megatherium* die unlöslichen Phosphorverbindungen in in Wasser lösliche Phosphorverbindungen umwandeln, wobei beide Bakterienarten die für das Wachstum und die Vermehrung erforderliche Energie gewinnen und gleichzeitig die Pflanzen mit Stickstoff und Phosphor versorgen.

[0015] Bei der Herstellung von Speiseölen entsteht, besonders am Ende der Produktion, ein Ölschlamm, der nicht weiter gereinigt werden kann und der weder zur Nutzung in der Lebensmittelindustrie noch für eine andere Anwendung, z. B. in der Kraftfahrzeugindustrie, geeignet ist. Die Entsorgung dieses

Ölschlamm kann nicht frei in der Umwelt durchgeführt werden; deshalb werden für die Entsorgung Neutralisations- und Kläranlagen benötigt. Daher ist es günstig, die beschriebene Eigenschaft des Bakteriums des Mikroorganismenstamms *Pseudomonas putida* CCM 4641 zu verwenden, der in der authentisierten Tschechischen Mikroorganismensammlung, Brno, Tvrdého Nr. 14 unter der oben angegebenen Nummer deponiert ist. Diese Mikroorganismen zersetzen durch ihre Wirkung die Ölverbindungen mit offener Kohlenwasserstoffkette zu Glycerin und organische Säuren.

[0016] Der Ölschlamm wird mit Fruchterde vermischt und diese Mischung wird mit Kulturen *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megatherium* und danach auch mit *Pseudomonas putida* geimpft. Die Mischung wird mehrmals vermischt, und der Inhalt des Ölschlammes wird in zwei bis drei Monaten mineralisiert und zersetzt. Nach der Anwendung im Ackerboden gemeinsam mit einer großen Mikroorganismenmenge stellt dieser Ölschlamm einen nährhaften Stoff mit den charakteristischen Eigenschaften von Stallung dar.

[0017] Die Erfindung kann derart verwendet werden, dass die dicke Biomasse von Mikroorganismen *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum* und *Bacillus megatherium* nach der Verdünnung in eine günstige Konzentration in der Menge von zehn Liter auf ein Hektar auf den Erdboden zerstäubt wird. Danach wird der Erdboden in Saattiefe gewendet, wobei der Boden gleichzeitig so geimpft wird, dass auf die Anwendung von stickstoffhaltigem und phosphorhaltigem Kunstdünger teilweise oder völlig verzichtet werden kann.

[0018] Weiterhin kann zu den oben genannten Mikroorganismenkulturen noch eine weitere Mikroorganismenkultur *Pseudomonas putida* zugegeben werden, wobei die Mischung so angewendet wird, dass zu zehn Tonnen des Erdbodens zehn Liter der günstig verdünnten Mikroorganismenmischung zugegeben wird und der Boden mehrmals vermischt wird. Mit diesem Verfahren können 500 Liter Ölschlamm zersetzt werden. Das Endprodukt des Verfahrens gemäß der Erfindung ist eine nährhafte Mischung reich an Mikroorganismen, die Stickstoff binden und Phosphor und Ölsediment zersetzen. Dieses Vierkomponentenmittel kann als Ersatz für Kunstdünger angewendet werden.

[0019] Der Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Mikroorganismenmischung zur Bindung von atmosphärischem Stickstoff, zur Erhöhung der Löslichkeit von unlöslichen Phosphor im Boden und zum Mineralisieren des Speiseölschlammes.

[0020] Nach der Erfindung vermehrt sich der Bakterienstamm *Azotobacter chroococcum* CCM 4642 im Nährboden, der weder organischen noch anorganischen Stickstoff enthält, durch subversive Fermentation bei einer Temperatur um 28°C während 22 Stunden; danach wird das Ferment des *Azobacter's* mit 10% des 22stündigen Impfstoffs des Bakterienstamms *Pseudomonas putida* CCM 4641 geimpft. Der Mikroorganismus des Stamms *Azobacter* produziert in 22 Stunden in das Fermentationsmedium eine solche Menge Stickstoff, die den Mikroorganismus des Stamms *Pseudomonas* zu ihrem Wachstum braucht. Die zweifache Fermentation wird noch 22–24 Stunden bei Belüftung mit 0,6 Liter Luft/1 Liter des Nährbodens, 120 Umdrehungen pro Minute und einer Temperatur von 28°C fortgesetzt. Nach der Beendigung der Kultivierung nach 44–46 Stunden liegt der pH-Wert des kultivierten Bodens im Bereich von 7,5–8,5 und der Anstieg der Zellenmenge in 1 ml des Mediums liegt beim Stamm *Azotobacter chroococcum* im Bereich von 4–6 Mrd. und beim Stamm *Pseudomonas putida* im Bereich von 150–200 Mio.

[0021] Weiterhin vermehrt sich nach der Erfindung der Bakterienstamm *Azospirillum brasilense* CCM 4644 im Nährboden, der weder eine organische noch anorganische Stickstoffquelle enthält, durch Fermentation bei einer Temperatur um 28°C während 22 Stunden; danach wird die vermehrte Kultur des Mikroorganismus *Azospirillum brasilense* mit 10% des 22-stündigen Impfstoffs des Bakterienstamms *Bacillus megatherium* CCM 4643 geimpft, wobei der Bakterienstamm *Azospirillum brasilense* während dieses Zeitraums im Nährmedium eine solche Menge Stickstoff produziert, die der Mikroorganismus des Stamms *Bacillus megatherium* zu seinem Wachstum braucht. Die zweifache Tauchfermentation wird noch 22–24 Stunden bei einer Belüftung mit 1 Liter Luft/1 Liter des Fermentationsmediums, bei 120 Umdrehungen pro Minute und einer Temperatur von 28°C fortgesetzt. Nach der Beendigung der Fermentation liegt der pH-Wert des Fermentationsmediums im Bereich von 6,8–8,5, und der Anstieg der Zellenmenge in 1 ml des Mediums liegt beim Stamm *Azospirillum brasilense* im Bereich von 4 Mrd. und beim Stamm *Bacillus megatherium* im Bereich von 200–300 Mio.

[0022] Bei der technischen Realisierung entsteht kein Nebenprodukt. Die Biomasse der Mikroorganismen kann als Ferment verwendet werden, das weiter nicht verarbeitet wird. Das Wasser kann nach dem Auswaschen von Fermentoren der Kanalisation zugeführt werden, da es das Flusswasser mit wertvollen Bakterienarten bereichert.

Ausführungsbeispiele der Erfindung

Beispiel 1

[0023] In einen Kolben werden 200 ml eines Gemischs mit einer Zusammensetzung von 0,3 g Kaliumdihydrogenorthophosphat, 0,2 g Kalziumchlorid, 0,3 g Magnesiumsulphat, 0,2 g Kaliumsulfat, 0,4 g Natriumchlorid, 0,05 g Eisen(III)-chlorid, 5,0 g Kalziumkarbonat, 30 g Melasse, 10,0 g gärfähigem Zucker auf 1000 ml des Nährbodens angesetzt, und während 40 Minuten wird der Boden bei einer Temperatur von 125°C sterilisiert. Danach wird 1 ml einer Spurenelementenlösung mit einer Zusammensetzung von 5,0 g Borsäure, 6,0 g Ammoniummolybdat, 0,5 g Kaliumjodid, 0,5 g Natriumbromid, 0,3 g Zinksulfat, 0,3 g Aluminiumsulfat auf 1000 ml des Nährbodens zugegeben. In den Inhalt einer lyophilisierten Ampulle der beiden Bakterienstämme *Azotobacter chroococcum* und *Azospirillum brasilense* werden 5 ml sterilisiertes Wasser zugegeben, und es wird eine Suspension gebildet. Mit 1 ml dieser Suspension werden beide Kolben geimpft. Die geimpften Kolben werden waagrecht in eine Schüttelanlage gelegt und bei einer Temperatur von 28°C und bei 160 Umdrehungen pro Minute während 48–72 Stunden kultiviert, bis die Biomasse ausreichend aufwächst. Auf diese Weise wird der Grundimpfstoff vorbereitet.

[0024] Weiterhin werden 400 ml des Nährbodens der obengenannten Zusammensetzung in einem Kolben angesetzt, mit 3–4 ml des Grundimpfstoffs geimpft und in einer waagerechten Schüttelanlage bei einer Temperatur von 28°C während 48 Stunden kultiviert. Auf diese Weise wird der Vorbereitungsimpfstoff vorbereitet.

[0025] Weiterhin werden 1000 Liter des Nährbodens in einem Fermentor bei 125°C während 40 Minuten sterilisiert und nach der Abkühlung mit 1,6 Liter des Vorbereitungsimpfstoffs geimpft. Der geimpfte Boden wird während 22 Stunden bei einer Temperatur von 28°C, bei einer Belüftung mit 0,6 Liter Luft/1 Liter des Fermentationsmediums und bei 120 Umdrehungen pro Minute fermentiert. Auf diese Weise wird von beiden Mikroorganismenarten ein Betriebsimpfstoff mit einer günstigen Konsistenz erhalten. Zur Unterdrückung der Schaumbildung wird 0,2–1,0 Liter/m³ eines Entschäumers zugegeben. Der pH-Wert des Nährbodens liegt im Bereich von 6,8–7,0.

Beispiel 2

[0026] In einen Kolben werden 200 ml des Nährbodens mit einer Zusammensetzung von 0,3 g Kaliumdihydrogenorthophosphat, 0,2 g Kalziumchlorid, 0,3 g Magnesiumsulphat, 30 g Melasse, 0,5 g Coorntee, 0,3 g Pepton und 5,0 g Kalziumkarbonat angesetzt, und diese Zusammensetzung wird während 40 Minuten bei einer Temperatur von 125°C sterilisiert.

[0027] In den Inhalt einer lyophilisierten Ampulle der beiden Bakterienstämme *Bacillus megatherium* und *Pseudomonas putida* werden 5 ml sterilisiertes Wasser zugegeben, und es wird eine Suspension gebildet. Danach werden mit 1 ml dieser Suspension beide Kolben geimpft. Die geimpften Kolben werden waagrecht in eine Schüttelanlage gelegt und bei einer Temperatur von 28°C und bei 160 Umdrehungen pro Minute während 48 Stunden kultiviert.

[0028] Weiterhin werden 400 ml des oben genannten Nährbodens in einem Kolben angesetzt, mit 1–2 ml des Grundimpfstoffs geimpft und in einer waagerechten Schüttelanlage bei einer Temperatur von 28°C während 24–48 Stunden gemischt, wobei der vegetative Stand der Kultur und die Bildung von Sporen unter dem Mikroskop festgestellt werden. Auf diese Weise wird der Vorbereitungsimpfstoff vorbereitet.

[0029] Weiterhin werden 1000 Liter des Nährbodens in einem Fermentor bei einer Temperatur von 125°C während 40 Minuten sterilisiert und nach der Abkühlung mit drei Stück des Vorbereitungsimpfstoffs mit einem Inhalt von 400 ml geimpft. Der geimpfte Boden wird während 22 Stunden bei einer Temperatur von 28°C, bei Belüftung mit 0,6 Liter Luft/1 Liter des Nährbodens und bei 120 Umdrehungen pro Minute fermentiert. Zur Unterdrückung der Schaumbildung wird 0,2–1,0 Liter/m³ eines Entschäumers zugegeben. Unter dem Mikroskop wird das Kulturenwachstum so beobachtet, dass es nur bis zum vegetativen Stand ohne Sporenbildung durchläuft. Der pH-Wert des Nährbodens liegt im Bereich 6,8–7,0.

Beispiel 3

[0030] In zwei Fermentoren mit einem Gesamthalt von 10–12 m³ und mit einem einzelnen Nutzungsvolumen von 5,0–6,0 m³ werden 4,5 und 4,5 m³ des nicht stickstoffhaltigen Nährbodens sterilisiert, der im Beispiel 1 beschrieben wurde, und dieser wird mit 10% des Betriebsimpfstoffs mit einem Inhalt des Bakterienstamms *Azotobacter chroococcum* nach Beispiel 2 geimpft. Danach wird er bei einer Temperatur von 28°C während 22 Stunden bei gleichzeitiger Belüftung mit 0,6 Liter Luft/1 Liter des Nährbodens und bei 120 Umdrehungen pro Minute kultiviert. Danach wird der fermentierte Boden noch mit 10% der Mikroorganismenkultur *Pseudomonas putida* nach Beispiel 2 geimpft, und weiter wird er in einer zweifachen Fermentation noch 22–24 Stunden weiterbehandelt. Nach der Beendigung der 44–46stündigen Fermentation liegt der pH-Wert des Nährbodens bei 7,7–8,5, und es wurde das Wachstum beim Bakterienstamm *Azotobacter chroococcum* von 4–8 Mrd. Zellen in 1 ml des Mediums und beim Stamm *Pseudomonas putida* von 200–300 Mio. Zellen in 1 ml des Mediums erreicht.

[0031] In zwei Fermentoren mit einem Nutzungsvolumen von 5,5–6,0 m³ werden 4,5 und 4,5 m³ des nicht stickstoffhaltigen Nährbodens angesetzt, der im Beispiel 1 beschrieben wurde, und er wird mit 10% des Betriebsimpfstoffs mit einem Inhalt des Bakterienstamms *Azospirillum brasilense* nach Beispiel 1 geimpft. Die Kultivierung dauert 22 Stunden bei einer Temperatur von 28°C, bei einer Belüftung mit 0,6 Liter Luft/1 Liter des Nährbodens und bei 120 Umdrehungen pro Minute. Danach wird das Fermentationsmedium noch mit 10% des Betriebsimpfstoffs der Mikroorganismenkultur *Bacillus megatherium* nach Beispiel 1 geimpft, und weiter wird eine zweifache Fermentation noch 22–24 Stunden fortgesetzt. Nach der Beendigung der Fermentation liegt der pH-Wert des Fermentationsmediums bei 7,5–8,5, und es wurde ein Wachstum beim Stamm *Azospirillum brasilense* von 4–6 Mrd. Zellen in 1 ml des Mediums und beim Stamm *Bacillus megatherium* von 200–300 Mio. Zellen in 1 ml des Mediums erreicht.

[0032] Nach dem Vermischen der beiden Fermentarten und nach ihrer Homogenisierung wird ein vierkomponentenhaltiges Endprodukt mit folgender Zusammensetzung erhalten: *Azotobacter chroococcum* 2–4 Mrd. Zellen/ml *Azospirillum brasilense* 2–4 Mrd. Zellen/ml, *Pseudomonas putida* 150–200 Mio. Zellen/ml und *Bacillus megatherium* 150–200 Mio. Zellen/ml, wobei in der vermehrten Biomasse insgesamt 4,3 Mrd. Zellen/ml bis zu 8,4 Mrd. Zellen/ml des Nährmediums vorhanden sind und der pH-Wert im Bereich von 7,5–8,5 liegt.

Industrielle Verwendbarkeit

[0033] Mithilfe des beschriebenen Verfahrens gemäß der Erfindung wird eine Mikroorganismenmischung zur Stickstoffbindung aus der Luft, zur Erhöhung der Löslichkeit von Phosphorverbindungen im Wasser und zur Zersetzung von Ölsediment aus der Lebensmittelindustrie vorbereitet, die in der Landwirtschaft verwendbar ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Vorbereitung einer Mikroorganismenmischung zur Bindung von atmosphärischem Stickstoff, zur Erhöhung der Löslichkeit von Phosphorverbindungen und zur Zersetzung von bei der Speiseölherstellung entstehenden Ölschlamm, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich durch gemeinsame Fermentation von zwei Mikroorganismenstämmen im nicht stickstoffhaltigen Nährboden mit einem Inhalt an Phosphorverbindungen die Bakterienstämme *Azotobacter chroococcum* CCM 4642 und *Azospirillum brasilense* CCM 4644 während 22 Stunden bei einer Temperatur von 28°C vermehren, dass dann diesen Bakterienstämmen der Bakterienstamm *Bacillus megatherium* CCM 4643 und der

Stamm *Pseudomonas putida* CCM 4641 zugesetzt wird und dass alle diese Bakterienstämme gemeinsam 44 bis 46 Stunden bei einer Temperatur von 28°C und bei einer Belüftung mit 0,6 Liter Luft/1 Liter des Nährbodens fermentiert werden.

2. Mischung oder Mittel mit einem Inhalt einer Mikroorganismenmischung zur Bindung von atmosphärischem Stickstoff, zur Erhöhung der Löslichkeit von Phosphorverbindungen und zur Zersetzung von bei der Speiseölherstellung entstehenden Ölschlamm zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie bzw. es aus zwei Mikroorganismenstämmen *Azotobacter chroococcum* CCM 4642 in einer Menge von 2–4 Mrd. Zellen/ml und *Azospirillum brasilense* CCM 4644 in einer Menge von 2–4 Mrd. Zellen/ml in einem nicht stickstoffhaltigen Nährboden mit einem Inhalt von Phosphorverbindungen und aus den Stämmen *Bacillus megatherium* CCM 4643 in einer Menge von 150–200 Mio. Zellen/ml und *Pseudomonas putida* CCM 4641 in einer Menge von 150–200 Mio. Zellen/ml zusammengesetzt ist, wobei in der vermehrten Biomasse insgesamt 4,3 Mrd. Zellen/ml bis 8,4 Mrd. Zellen/ml des Nährmediums vorhanden sind und der pH-Wert im Bereich 7,5–8,5 liegt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen