

(19)



(10) **LT 5587 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5587** (51) Int. Cl. (2006): **C12N 1/26**
C12N 1/00
(21) Paraiškos numeris: **2008 100** **C12N 1/14**
C12N 1/16
(22) Paraiškos padavimo data: **2008 12 22** **C12N 1/20**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2009 06 25**
(45) Patento paskelbimo data: **2009 08 25**
(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
(30) Prioritetas: —
(72) Išradėjas:
Rapolas LIUŽINAS, LT
Karolis JANKEVIČIUS, LT
Algimantas PAŠKEVIČIUS, LT
Jūratė REPEČKIENĖ, LT
(73) Patento savininkas:
VšĮ „Grunto valymo technologijos“, Antakalnio g. 42, LT-10304 Vilnius, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Genė Ona SRUOGIENĖ, A.P.Kavoliuko g. 24-152, LT-04328 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Naftą oksiduojančių mikroorganizmų terpės gavimo būdas ir tuo būdu gauta terpė
(57) Referatas:

Išradimas priklauso biotechnologijos, ekologinės mikrobiologijos ir aplinkos apsaugos sritims ir tinka naudoti vandens ir grunto užterštumo lygiui įvertinti, naujų naftos telkinių paieškai, vandens ir grunto, užteršto nafta bei jos produktais, biologinio valymo *ex situ* arba *in situ* sąlygomis intensyvumui įvertinti. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM) terpės gavimui į ją įneša naftos produktus, pagrindinius biogeninius mitybos elementus, mikroorganizmus kultivuoja aerobinėmis sąlygomis esant palankiam temperatūros režimui bei NOM, pasižyminčių skirtingomis fiziologinėmis-biocheminėmis savybėmis, geram vystymuisi užtikrinti į terpę įdeda naftą ir karbohidratus kaip anglies šaltinį, subalansuoja anglies, azoto, fosforo, kalio tarpusavio kiekius, įterpia mikroelementus, vitaminus, kompleksonus, svarbius naftą skaidančių mikroorganizmų veiklai intensyvinti. NOM terpė, pavadinta 'Liužino-GVT' terpė, apima naftos produktus, pagrindinius biogeninius mitybos elementus, azotą, fosforą, kalį, magnį, kalcį, naftą, sacharozę (arba melasą), sojos miltus, alaus misą, NaNO_3 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 ,

MgSO₄x7H₂O, CaCl₂x6H₂O, FeSO₄x7H₂O; mikroelementus druskų pavidalu: ZnSO₄x6H₂O, MnSO₄x4H₂O, KJ, H₃BO₄, (NH₄)₆Mo₇O₂₄x7H₂O, CuSO₄x5H₂O, CoCl₂x6H₂O; vitaminus: tiaminą (B₁), riboflaviną (B₂), pantoteno rūgštį (B₅), nikotino rūgštį (PP), piridoksiną (B₆); kompleksoną EDTA (etilendiaminotetraacto rūgštį) ir vandenį.

Išradimas priklauso biotechnologijos, ekologinės mikrobiologijos ir aplinkos apsaugos sritims ir tinka naudoti vandens ir grunto užterštumo lygiui įvertinti, naujų naftos telkinių paieškai, vandens ir grunto, užteršto nafta bei jos produktais, biologinio valymo *ex situ* arba *in situ* sąlygomis intensyvumui įvertinti.

Pastaraisiais metais identifikuota apie 100 naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM) rūšių (prieš keliasdešimt metų jų buvo žinoma tik kelios rūšys). Šios rūšys priklauso *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Debaromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma* ir kt. gentims (sud. Jankevičius K., Liužinas R., Aplinkos biologinis valymas, V. 2003, 343 p.). Jų fiziologinės-biocheminės savybės yra skirtingos. Vienos rūšys (*Trichoderma lignorum*) bei smulkesni jų taksonai įsisavina gliukozę, sacharozę, manitą, krakmolą ir kitokius karbohidratus, nitratus, amonio druskas, baltymų hidrolizatus, aminorūgštis. Kitos rūšys (*Acetobacter pastorianus*) nesugeba fermentuoti gliukozės, sacharozės bei daugelio kitų angliavandenių. Skirtinga NOM mityba išryškėja ne tik vartojant anglies (C) bei azoto (N) mitybos šaltinius, bet ir kitą jų mineralinę mitybą.

Šiuo metu NOM kiekiui aplinkoje nustatyti naudojamos kelios dešimtys mitybinių terpių. Buvo atlikta dažniausiai naudojamų NOM kiekiui nustatyti Čapeko, Raimondo ir kaupiamosios kultūros mineralinės mitybinės terpės (žiūrėti - sud. Jankevičius K., Liužinas R., Aplinkos biologinis valymas, V. 2003, p. 123, p. 136), bei 13-os mitybinių agarizuotų terpių, parinktų pagal įvairius mikrobiologinės literatūros šaltinius, revizija, įvertinant jų mitybines galias pagal išaugusių NOM (bakterijų ir mikromicetų) skaičių. Atlikti bandymai parodė nagrinėtų NOM mitybinių terpių tinkamumą ir jų trūkumus. Tai parodyta toliau pateiktais bandymų pavyzdžiais.

Atliktais bandymais parodyta (1 pavyzdys), kad identifikuojant NOM įvairovę (jų štamus) tinkamesnė yra Čapeko (palyginti su Raimondo) mineralinė mitybinė terpė. Čapeko terpėje išaugo 38 štamai, kai Raimondo – tik 10 (kontroliniame variante – be angliavandenių išaugo

išaugo 38 štamai, kai Raimondo – tik 10 (kontroliniame variante – be angliavandenilių išaugo 97 kultūros). Tas paaiškinama NOM citoplazmos koloidų ir mitybinės terpės jonų sąveika. Į NOM ląsteles iš terpės patenka ne vienos, o kelių rūšių jonai. Vyrauja tie jonai, kurių kinetinė energija yra didesnė. Kai terpėje santykis tarp jonų yra subalansuotas (fiziologiškai išlygintas), tokia terpė NOM vystymuisi yra tinkamesnė.

Tolesni tyrimai (2 pavyzdys) parodė, kad dar geriau subalansuota nei Čapeko mitybinė terpė yra kaupiamosios kultūros terpė. Pastarojoje išauginta NOM 10 kultūrų, kai Čapeko terpėje tik 3 (panaudotas kitoks nei 1 pavyzdyje atveju naftinės taršos šaltinis).

Žinomų 13 mitybinių terpių tinkamumą NOM auginti įvertinome tokiu būdu. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų šaltiniu (inokuliatu) naudojome nuo naftos produktų dalinai apvalytą gruntą. Jis imtas iš 7 vietų (maždaug po 100 g) ir sudarytas bendras mėginys. Prieš bandymą gruntas pertrinamas ir gerai sumaišomas. Atsveriamas 10 g grunto, patalpinama į kolbutę su 90 ml sterilaus vandentiekio vandens ir kratoma 10 min. Pirmas skiedimas atitinka 1:10 arba 10^{-1} skiedimą. Gauta suspensija skiedžiama pernešant 1 ml suspensijos į mėgintuvėlį su 9 ml sterilaus vandens. Taip paruošiamas keletas praskiedimų 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000 (iki 10^{-5}). Iš pasirinkto suspensijos praskiedimo po 1 ml pilama į Petri lėkštelę ir užpilama ištirpinta praaušusia agarizuota mitybinė terpė. Kai kuriais atvejais sėta paviršiniu būdu, kai 0,1 ml suspensijos paskleidžiama sustingusios terpės paviršiuje špateliu. Petri lėkštelės su mikroorganizmais inkubuojamos termostate 26°C temperatūroje 5-10 parų. Suskaičiuojamos išaugusios mikroorganizmų kolonijos ir apskaičiuojamas jų pradų (kolonijas sudarančių vienetų – ksv) kiekis 1 g sauso grunto.

Analitinėmis svarstyklėmis atsveriamas 1 g tiriamo grunto, patalpinamas į stiklinius biuksus ir džiovinamas 105°C temperatūroje iki pastovaus svorio. Mikroorganizmų skaičius skaičiuojamas pagal formulę $n = abc/d$, kur n – mikroorganizmų (ląstelės arba kolonijas sudarantys vienetai - ksv) skaičius 1 g sauso grunto, a – lėkštelėje išaugusių kolonijų skaičius, b – suspensijos praskiedimas, c – pasėtos suspensijos tūris (ml), d – sauso dirvožemio svoris. Vidurkis skaičiuojamas iš trijų pakartojimų (LST ISO 10381-6, 1998). Tyrimai atlikti naudojant 13 standžių terpių (pridedant po 2 % agaro), parinktų pagal įvairius mikrobiologinės literatūros šaltinius. Tyrimų rezultatai pateikiami 3-5 pavyzdžiuose. Juose nurodoma terpės

eilės numeris, pavadinimas, literatūros šaltinis ir tyrimų duomenys. Terpės surikiuotos (didėjančia tvarka) pagal mikroorganizmų (bakterijų, mielių, mikromicetų), išaugusių ant tiriamųjų mitybinių terpių, skaičių ($\text{ksv} \times 10^4$).

NOM minimalus skaičius (nuo 33,2 – 4 terpė iki 99,4 $\text{ksv} \times 10^4$ - 8 terpė) išaugo 2, 4, 8, 12 terpėje. Tarpinę padėtį užėmė 1, 3, 9, 10, 11, 13 terpė (nuo 131,0 – 1 terpė iki 177,7 $\text{ksv} \times 10^4$ – 3 terpė). Didžiausias NOM skaičius rastas 5, 6, 7 terpėse (nuo 244, 2 – 5 terpė iki 322,9 $\text{ksv} \times 10^4$ – 6 terpė). Skirtumas tarp NOM mažiausio ir didžiausio skaičiaus, rasto mitybinėse terpėse, yra didžiulis (33,2 $\text{ksv} \times 10^4$ - 4 terpė ir 322,9 $\text{ksv} \times 10^4$ – 6 terpė). Jis sudaro beveik 970 % (9,7 karto). Šį skirtumą galima paaiškinti tuo, kad 4 terpės jonų santykis nėra subalansuotas. 4 terpėje daugiau fosforo (P) nei azoto (N). 6 terpėje N:P santykis yra normalus, atitinka NOM ląstelėse esantį N:P santykį. NOM ląstelėse azoto randama nuo 10 iki 12 %, (bakterinėse ląstelėse 12 %, mikromicetų 10 %). Fosforo kiekis NOM sausoje biomasėje siekia 1,5 %. Tokiu būdu N:P = 10-12 : 1,5. Tokio šių pagrindinių mitybos elementų santykio nėra 2, 4, 8, 12 terpėse (3 pavyzdys); 3, 9, 10, 11, 13 terpėse (4 pavyzdys). Daugelyje aptariamųjų terpių 2, 4, 12 (3 pavyzdys); 1, 3, 9, 13 (4 pavyzdys); 5, 6 (5 pavyzdys) naudojamos amonio druskos. Autoklavuojant šias terpes, kai pH esti žemiau 7, dalis amoniako išgaruoja, ir terpės azoto deficitas dar labiau padidėja.

Terpėse, išskyrus 2 terpę, nėra mikroelementų Zn, Mn, Cu, Co, J, B, Mo. Šie mikroelementai esti NOM oksidacinių-redukcinių fermentų sudėtyje, vadinami kofaktoriais, ir terpėje reikalingi.

Terpėse (išskyrus 4 terpę, kai panaudojamas tik vienas vitaminas – tiaminas) nėra vitaminų. Tokie vitaminai kaip tiaminas (B_1), riboflavinai (B_2), pantoteno rūgštis (B_5), nikotino rūgštis (PP), piridoksinas (B_6) įeina į NOM fermentų sudėtį, sudaro jų sudėtinę dalį – kofermentus, ir turi būti naudojami.

Nei vienoje (iš 13) terpėje nepanaudoti kompleksiniai organiniai junginiai, sudarantys su metalų katijonais kompleksinius junginius. Mikroelementų iškritimo į nuosėdas išvengiama tuo atveju, kai juos sujunginama į ciklinius kompleksinius junginius vadinamus chelatus (žnyplinius junginius). Ypač svarbu išsaugoti terpėje geležį (Fe). Ji įeina į daugelį NOM fermentų (kofaktorių) sudėtį. Šiam reikalui naudojami kompleksus sudarantys junginiai:

EDODA – etilendinitril-N,N'-bis(2'-oksifenil)-N,N'-diacto rūgštis; DCTA – diaminocikloheksano – N,N-tetracetatas; NTA – nitriltriacetatas; polifosfatas – $[P_nO_{3n+1}]^{(n+2)-}$, kur $n \approx 5$; SSR – 5-sulfosalicilo rūgštis ir EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis.

Aptariamose terpėse naudojamos (kaip anglies šaltinis) didelės naftos produktų (angliavandenilių mišinys, benzinas, mazutas, nafta) koncentracijos. Dažniausiai jos siekia 10,0 ml/l (3, 4, 5 pavyzdžiai), kai kuriose terpėse (2, 4) net 50,0 ml/l, ir tik vienintelėje 3-oje Bushnell-Haas terpėje (žiūrėti - sud. Jankevičius K., Liužinas R., **Aplinkos biologinis valymas, V. 2003, p. 123**) panaudota 0,5 ml/l angliavandenilių. Naftos produktai NOM taip pat, kaip ir kitus mikroorganizmus bei makroorganizmus, dalinai apnuodija (inhibuoja).

Naftą oksiduojančius mikroorganizmus (NOM) skirstomi į dvi grupes – hidrofilinius ir lipofilinius mikroorganizmus. Dvifazėje sistemoje vanduo – angliavandeniliai (nafta ar jos produktai), hidrofiliniai mikroorganizmai telkiasi vandens, o lipofiliniai – angliavandenilių (naftos) fazėje. Hidrofiliniai mikroorganizmai skaido tik tuos naftos junginius, kurie ištirpę vandenyje, lipofiliniai – vystosi pačioje naftoje, jos plėvelėje, naftai yra atsparūs. Gamtinėmis sąlygomis vyrauja hidrofiliniai NOM, lipofiliniai NOM mažiau išplitę, priklauso *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* gentims. Naftos bei jos produktų slopinamąjį poveikį NOM hidrofilams matome palyginę mikroorganizmų, išaugusių 3 ir 13 terpėse (4 pavyzdys). Terpės savo sudėtimi yra vienodos, skiriasi tik naftos produkto kiekis jose (3 terpėje - 0,5 g/l, o 13-oje - 100 g/l). 3-oje terpėje NOM skaičius yra didesnis ($177,7 \text{ ksv} \times 10^4$) nei 13-oje ($160,0 \text{ ksv} \times 10^4$). Kur kas išsamiau NOM augimo priklausomybė nuo naftos produkto ir jo koncentracijos parodyta specialiu tyrimu (6 pavyzdys). Didžiausias NOM skaičius nustatytas terpėse (6 ir 13 terpės), kai anglies šaltiniu naudojama nafta. Geriausiai NOM vystosi, esant mažiausiai naftos produkto koncentracijai (6-je terpėje, esant 5 g/l naftos produkto NOM skaičius siekia $129,7 \text{ ksv} \times 10^4$, o esant 50 g/l naftos produkto NOM skaičius - tik $27,8 \text{ ksv} \times 10^4$, taigi naftos produkto kiekį terpėje padidinus 10 kartų, NOM skaičius terpėje sumažėja 4,7 karto). Tokią pat NOM skaičiaus kaitą stebima, naudojant 13-ąją terpę. NOM skaičius, padidinus naftos kiekį terpėje nuo 5,0 g/l iki 50,0 g/l, sumažėja 7,3 karto. Ši dėsninga NOM skaičiaus kaita priklausomai nuo naftos ar jos produktų kiekio terpėje matoma anglies šaltiniu naudojant dyzeliną ir mazutą (6 pavyzdys).

Šie duomenys yra svarbūs ne tik analizuojant 1-13 mitybines terpes, bet ir valant naftos produktais užterštą gruntą *ex situ* sąlygomis. Valomas gruntas, siekiant sudaryti palankesnes NOM fermentinei veiklai sąlygas, turi būti maišomas su jau išvalytu gruntu taip, kad valomajame grunte naftos produktų (pvz., mazuto) kiekis neviršytų 30,0 g/kg grunto. Tokio grunto biovalymas vidutinio klimato sąlygomis (Lietuvoje) užtrunka apie 90-100 parų (užtenka vieno vegetacinio periodo).

Artimiausia iš 13-os NOM auginimui naudojamų terpių, kaip prototipas, pasirinkta Bushnell-Haas terpė (jos sudėtis pateikta 4 pavyzdyje). Joje gerai auga naftą oksiduojančios bakterijos, mieliagrybiai ir mikromicetai. Tai parodyta specialiu bandymu (7 pavyzdys).

Šios terpės trūkumas yra tas, kad joje nepanaudotas molibdenas (Mo), kuris svarbus NOM mitybai. Taip pat nepanaudoti mikroelementai Zn, Mn, Cu, Co ir kt., vitamininės medžiagos (tiaminas, riboflavinai, pantoteno rūgštis ir kt.), įeinančios į NOM oksidazių-reduktazių ir kitų fermentų sudėtį. Terpėje nėra kompleksonų, kurie sudaro su metalų katijonais kompleksinius junginius ir neleidžia jiems iškristi į nuosėdas.

Išradimo uždavinys – pagerinti nafta bei jos produktais užterštoje aplinkoje NOM kiekiui nustatyti vartojamų terpių sudėtį, parengti NOM augimui tinkamesnę, nei iki šiol naudojamos, mitybinę terpę, kai aerobinėmis sąlygomis išauginama didesnis NOM skaičius, tiksliau parodantis aplinkos (grunto, vandens) taršos naftos produktais lygį.

Uždavinys išsprendžiamas panaudojant NOM augimui būtinus elementus ir biologiškai aktyvias medžiagas, įeinančias į NOM fermentų, skaidančių naftą ir jos produktus, sudėtį.

Naftą oksiduojančių mikroorganizmų terpės gavimui į ją įneša naftos produktus, pagrindinius biogeninius mitybos elementus, mikroorganizmus kultivuoja aerobinėmis sąlygomis esant palankiam temperatūros režimui, taip pat į terpę įdeda neapdorotą naftą ir karbohidratus kaip anglies šaltinį, subalansuoja anglies, azoto, fosforo, kalio tarpusavio kiekius, įterpia mikroelementus, vitaminus, kompleksonus, svarbius naftą skaidančių mikroorganizmų veiklai intensyvuoti.

Siūlomoje terpėje greta naftos produktų kaip anglies šaltinį naudoja naftą 1,0–5,0 ml/l ir sacharozę 2,0–10,0 g/l, o tam, kad būtų sudarytas buferinis tirpalas, palaikantis terpės vandenilio jonų koncentraciją pH lygia 7, fosforo šaltiniu naudoja KH_2PO_4 0,9–1,0 g/l ir K_2HPO_4 0,4–0,5 g/l, be to palaiko optimalų terpės C:N:P:K santykį, atitinkantį mikroorganizmų ląstelės elementų sudėtį, kuris sudaro 100:5-7:1:1.

Į terpę įveda cinko (Zn), mangano (Mn), jodo (J), boro (B), molibdeno (Mo) mikroelementus, kiekvieno 0,004–0,005 g/l koncentracijos ir vario (Cu), kobalto (Co) mikroelementus, kiekvieno maždaug 0,001 g/l koncentracijos.

Be minėtų mikroelementų į terpę įdeda vitaminus, tokius kaip tiaminą (B_1), riboflaviną (B_2), pantoteno rūgštį (B_5), nikotino rūgštį (PP), piridoksiną (B_6), kiekvieno jų ne daugiau kaip 0,2 mg/l, o naftą oksiduojančių mikroorganizmų grupes, platų jų spektrą, kultivuoja agarizuotoje terpėje 23–26°C temperatūroje, geriau 25–26°C temperatūroje.

Taip paruoštoje terpėje ir esant subalansuotiems anglies, azoto, fosforo, kalio tarpusavio kiekiams įterpus mikroelementus, vitaminus, kompleksonus, svarbius naftą skaidančių mikroorganizmų veiklai intensyvinti ir palaikant optimalia terpės temperatūra, užtikrinamas NOM gyvybingumas, geras vystymasis ir intensyvus dauginimasis, o tuo pačiu ir pasiekiamas tikslas - aerobinėmis sąlygomis išauginama didesnis NOM skaičius.

NOM augimui būtinus elementus skirstomi į 3 grupes. Jas sudaro augimui būtini elementai – be pagrindinių C, H, O, N, P, K, S, Mg, reikalingi Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn elementai; mažesnio poreikio elementai – B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, J; ir elementai, kurių poreikis visai menkas – Be, F, Se, Ti, Ga, Ge, Br, Zr, W.

NOM naudoja įvairias azoto (N) formas – organinį ir neorganinį azotą. Kai kurios aminorūgštys veikia kaip augimo faktoriai. Asparagino rūgštis ir alaninas įjungiamas į bakterijų ląstelių sienelės. Formuojamoje terpėje naudojamas nitratas (NaNO_3), o aminorūgščių šaltiniu – sojos miltai.

Fosforas (P) NOM terpėje naudojamas neorganinių fosfatų pavidalu (glicerofosfatas bei fosfolipidai beveik nenaudojami). Naudojamas KH_2PO_4 ir K_2HPO_4 , kas leidžia terpės pH išlaikyti neutralioje (pH – 7) būklėje.

Kalis (K) susijęs su ribonukleino rūgščių gamyba. Jo poreikis priklauso nuo terpės pH. Kai pH sumažėja nuo 7 iki 6 (terpė parūgštėja), tuomet K kiekis ląstelėse padidėja 30 %.

Magnis (Mg) svarbus NOM augimui. Kai jo trūksta, sumažėja NOM augimo intensyvumas. Mg į terpę įvedamas MgSO_4 pavidalu. Siera (S) NOM naudojama aminorūgščių cisteino ir metionino sintezei, o taip pat kai kurių vitaminų (tiamino, biotino) gamybai.

NOM augimui reikalingi mikroelementai (įeina į fermentų sudėtį) Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Mo, J, B ir vitaminai - tiaminas (B_1), riboflavinai (B_2), pantoteno rūgštis (B_5), nikotino rūgštis (PP), piridoksinas (B_6) (dalyvauja kofermentų sudėtyje). Šios biologiškai aktyvios medžiagos terpėje panaudojamos. Jų kiekis terpėje nustatomas remiantis NOM sausoje biomasėje esama šių junginių koncentracija.

Sudarytoje terpėje, siekiant išvengti Fe nuostolių, naudojamas kompleksonas EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis, kuri sudaro kompleksinius junginius su mikroelementais ir taip pašalina jų iškritimą ir nusėdimą. Kompleksono į terpę įdeda maždaug 0,15 g/l.

Siūloma naftą oksiduojančių mikroorganizmų terpė apima naftos produktus, pagrindinius biogeninius mitybos elementus, azotą, fosforą, kalį, magnį, kalcį, ir jos turinį sudaro: nafta – 1,0–5,0 ml/l, sacharozė (arba melasa) – 2,0–10,0 g/l, sojos miltai – 5,0 g/l, alaus misa – maždaug 5,0 ml/l; makroelementai druskų pavidalu: NaNO_3 – 3,0 g/l, KH_2PO_4 – 0,9–1,0 g/l, K_2HPO_4 – 0,4–0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 g/l, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 g/l, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02 g/l; mikroelementai druskų pavidalu: $\text{ZnSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, KJ, H_3BO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 7\text{H}_2\text{O}$, kiekvieno jų ne daugiau kaip po 0,005 g/l; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, kiekvieno jų ne daugiau kaip po 0,001 g/l; vitaminai: tiaminas (B_1), riboflavinai (B_2), pantoteno rūgštis (B_5), nikotino rūgštis (PP), piridoksinas (B_6), kiekvieno jų ne daugiau kaip po 0,2 mg/l; kompleksonas EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis) – maždaug 0,15 g/l ir vanduo iki 1000 ml.

Tokios sukurtos kompozicijos NOM mitybinė terpė (jos sudėtis pateikiama 7 pavyzdyje) užtikrina naftą oksiduojančių mikroorganizmų (įvairių bakterijų, mieliagrybių, mikromicetų rūšių), pasižyminčių skirtingomis fiziologinėmis-biocheminėmis savybėmis, gerą vystymąsi ir yra tinkamas taršos naftos produktais indikatorius.

Naujai sukurtai naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM) terpei išradimo autorių kolektyvas nusprendė suteikti pavadinimą „Liužino-GVT terpė“.

Didelis siūlomos Liužino-GVT terpės privalumas bei pranašumas, o kartu ir išradimo esmė yra ta, kad ją sudarančiais veiksniais (C:N:P:K santykis, atitinkamos koncentracijos 7 mikroelementų, 5 vitaminų panaudojimas, kompleksono EDTA įvedimas į terpę, pH reguliavimas) užtikrinamas terpės stabilumas. Ją sudarantys ingredientai, jų kiekiai ir tarpusavio sąveika pilnai atitinka įvairius NOM fiziologinių grupių mitybinius reikalavimus.

1 pavyzdys. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM) mitybinių terpių privalumų, identifikuojant NOM, vertinimas

Eksperimentiškai vertinamos Čapeko ir Raimondo terpės.

Čapeko terpės sudėtis, g/l:		Raimondo terpės sudėtis, g/l:	
Sacharozės	30,0	NH ₄ Cl	2,0
NaNO ₃	2,0	NaCl	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0	Na ₂ HPO ₄	3,0
KCl	0,5	KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0
Distiliuoto vandens	1000 ml	CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,01
Terpė sterilizuojama 15-20 min. autoklave, 120°C temperatūroje. Jei reikalinga kieta terpė, pridedama 20,0 g agaro		MnSO ₄ x 5H ₂ O	0,02
		FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01
		Sacharozės	30,0
		Distiliuoto vandens	1000 ml

Identifikuojant NOM, terpėse sacharozę (kaip anglies šaltinis) pakeista mazutu 10,0 g/litru.

Naudotos agarizuotos terpės.

Naftą oksiduojančių mikroorganizmų (kultūrų, štamų) identifikavimo rezultatai:

Eil. Nr.	Mikroorganizmų gentis	Kultūrų skaičius	Štamų, naudojančių mazuto angliavandenilius, skaičius	
			Čapeko terpė	Raimondo terpė
1	Pseudomonas	5	2	2
2	Bacillus	12	8	1
3	Lactobacillus	2	1	-
4	Rhodococcus	8	8	2
5	Micrococcus	1	-	-
6	Streptomyces	22	9	-
7	Micromonospora	1	-	-
8	Penicillium	19	-	-
9	Serratia	5	5	3
10	Aspergillus	17	-	-
11	Acetobacter	2	2	1
12	Trichoderma	3	3	1
Viso		97	38	10

Išvada: Čapeko terpė yra tinkamesnė NOM identifikavimui. Mikroorganizmai (eil. Nr. 5, 7, 8, 10) augo tik kontrolėje be naftos angliavandenilių.

2 pavyzdys. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM) mitybinių terpių, naudojamų NOM identifikuoti, palyginimas

Panaudotos 3 skirtingos sudėties mitybinės terpės:

Čapeko terpė, g/l:		Jamados terpė, g/l:		Kaupiamosios kultūros terpė, g/l:	
NaNO ₃	2,0	KH ₂ PO ₄	2,5	KNO ₃	4,0
KH ₂ PO ₄	1,0	NH ₄ NO ₃	5,0	KH ₂ PO ₄	0,6
KCl	0,5	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,0	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	1,4
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	mazutas	10,0	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,8
Mazutas (vietoje sacharozės 30 g)	10,0 ml	Distiliuotas vanduo	1000 ml	mazutas	10,0
Distiliuotas vanduo	1000 ml			Distiliuotas vanduo	1000 ml

Naftą oksiduojančių mikroorganizmų identifikuojant rezultatai.

Grunto mėginių Nr.	Čapeko terpė	Jamados terpė	Kaupiamosios kultūros terpė
1-11	Trichoderma sp., Mycelia sterilia, Penicillium sp.	Trichoderma sp., Mycelia sterilia	Cladosporium sp., Penicillium sp., Penicillium funiculosum., Mucor sp., Aspergillus sp., Aspergillus flavus, Aspergillus terreus, Rhizopus stolonifer, Fusarium sp., bakterijos

Tyrimo rezultatai parodė, kad naudojant Čapeko ir Jamados terpes išskirtas negausus NOM kultūrų skaičius. Kur kas gausesnis NOM (mikromicetų ir bakterijų) kultūrų skaičius išskirtas kaupiamajam metodui naudota terpė.

3 pavyzdys. Mikroorganizmų, išaugusių 2, 4, 8 ir 12 terpėje (sudėtis nurodoma), skaičius (ksv $\times 10^4$).

2. Mineralinė druskų terpė bakterijoms (Appl. Environm. Microbiol. 1982, 43), g/l:

Na ₂ HPO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,4
Mikroelementų tirpalas	2,0 ml
Angliavandeniliai	5 %
pH	7,2

Mikroelementų druskos pavidalu tirpalas, g/100 ml: FeSO₄ x 7H₂O - 0,1; ZnSO₄ x 7H₂O - 0,88; CuSO₄ x 5H₂O - 0,04; MnSO₄ x 4H₂O - 0,015; Na₂B₄O₇ - 0,01; (NH₄)₆MoO₂ x 4H₂O - 0,005.

Terpės Nr.	Bakterijos	Mielės	Mikromicetai
Nr. 2	86,5±23,2	2,9±0,8	6,4±2,5

4. Druskų terpė mikromicetams (Braz. J. Mikrobiol, 2001, Vol 32, Nr. 4), g/l:		8. Druskų terpė kitiems mikroorganizmams (Zviagincev D., Metody pochvennoj mikrobiologii i biokhimiyi, M. 1991), g/l:	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	KNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	0,3	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,4
KH ₂ PO ₄	0,8	KH ₂ PO ₄	0,3
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,3	Na ₂ HPO ₄	0,7
CaCl ₂	0,05	Vandentiekio vanduo	1000 ml
ZnSO ₄ x 6H ₂ O	0,004	PH	apie 7
Tiaminas	1,0 ml (100 mkg/ml)	Benzino ar kito naftos produkto	1 %
Angliavandenilio	5 %		

Terpės Nr.	Bakterijos	Mielės	Mikromicetai
Nr. 4	25,0±3,6	1,6±0,2	6,6±0,7
Nr. 8	90,0±7,0	3,5±0,0	5,9±2,8

12. Jamados terpė grybams (Aplinkos biologinis valymas, Mikroorganizmų atranka ir panaudojimas, V., 2003), g/l:

KH₂PO₄ – 2,5

NH₄NO₃ – 5,0

MgSO₄ x 7H₂O – 1,0

Mazutas – 10,0

Terpės Nr.	Bakterijos	Mielės	Mikromicetai
Nr. 12	23,2±9,7	4,7±2,0	10,9±1,4

4 pavyzdys. Mikroorganizmų išaugusių 1, 3, 9, 10, 11, 13 terpėje (sudėtis nurodoma), skaičius (ksv x 10⁴)

1. Druskų terpė bakterijoms (Mikrobiologija (RU), 1987, t. 56, Nr. 4), g/l:		3. Bushnell-Haas terpė, g/l:	
NH ₄ NO ₃	1,0	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2
MgCl ₂	0,1	K ₂ HPO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	3,0	KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	7,0	FeCl ₃	0,05
CaCO ₃	1,0	NH ₄ NO ₃	1,0
Nafta (arba atskiri angliavandeniliai)	10,0 (8,0)	CaCl ₂	0,02
PH	apie 7,2	Angliavandeniliai	0,5

9. Bakterijoms (Biodegradation of crude oil in sando sediment, International biodeteration, vol. 44, 1999), g/l:		10. Bakterijoms (Ilichev V., Biopovrezhdenija, M. 1987), g/l:	
NH ₄ Cl	2,0	NaNO ₃	2,0
NaCl	5,0	KH ₂ PO ₄	1,0
Na ₂ HPO ₄	3,0	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	0,1	KCl	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0	MnSO ₄ x 5H ₂ O	0,02
CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,01	FeSO ₄	0,01
MnSO ₄ x 5H ₂ O	0,02	Mazuto	10,0
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	PH	apie 7
Mazuto	10,0		
PH	6,7-7		

11. Grybams (Soil sampling and methods of analyses, London, Tokyo, 1993), g/l:

Čapeko terpė be sacharozės, naftos produktų – 1 %.

13. Bushnell-Haas terpė (nuo terpės Nr. 3 skiriasi angliavandenilio kiekiu), g/l:

Bushnell-Haas Broth (Difco),

Pridedama 10 % naftos produkto.

Gaminama distiliuotame vandenyje (1000 ml).

MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0
FeCl ₃	0,05
NH ₄ NO ₃	1,0
CaCl ₂	0,02

Nustatomas pH 7–7.2, rūgštinant su HCl arba šarminant su NaOH ir autoklavuojama 15 min.

Terpės Nr.	Bakterijos	Mielės	Mikromicetai
1	122,8±44,6	3,5±1,6	4,7±1,6
3	169,5±1,6	0	8,2±3,3
9	119,3±28,0	1,8±0,7	10,1±8,4
10	122,8±1,6	2,9±0,8	7,0±0
11	124,0±8,4	6,2±3,6	5,5±2,9
13	147±9,99	5,3±0,8	7,8±1,4

5 pavyzdys. Mikroorganizmų, išaugusių 5, 6, 7 terpėje (sudėtis nurodoma) skaičius (ksv x 10⁴)

5. Mielės (Methody eksperimentalnoj mikologii, spravočnik, Kiev, 1982), g/l:

(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,5
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
NaCl	0,5
Benzino ar kito naftos produkto	10,0
pH	6,5

6. Mielėms (Soil sampling and methods of analyses, London, Tokyo, 1993), g/l:

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
K ₂ HPO ₄	0,15
KH ₂ PO ₄	0,85
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
NaCl	0,1

CaCl₂ 0,1
Mazuto 10,0

7. Mielėms (Biodegradation of crude oil in sando sediment, International biodeteration, vol. 44, 1999), g/l:

Mielų azotinis pagrindas (Difco) 6,7

Mazutas 10

Terpės Nr.	Bakterijos	Mielės	Mikromicetai
5	228,0±11,3	6,5±0,4	9,7±2,8
6	300,6±13,2	7,0±1,4	15,3±2,8
7	258,0±83,0	5,3±0,4	9,1±3,5

6 pavyzdys. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM), skaičius (ksv x 10⁴), išskirtas ant dviejų mitybinių terpių, naudojant skirtingus angliavandenilius ir skirtingas jų koncentracijas

Anglies šaltinis	Naftos produkto koncentracija, %	Bakterijos		Mielės		Mikromicetai	
		Terpė Nr. 6	Terpė Nr. 13	Terpė Nr. 6	Terpė Nr. 13	Terpė Nr. 6	Terpė Nr. 13
Dyzelinas	0,5	27,7±7,5	118,5±16,4	2,3±1,5	1,3±1,1	7,4±2,9	5,8±1,2
	1,0	20,3±1,4	159,±4,7	1,0±0,0	1,0±1,0	6,6±0,7	13,6±2,9
	5,0	7,0±0	27,3±3,6	0,3±0,6	3,0±0,0	5,1±1,4	14,4±1,8
Nafta	0,5	117,0±8,1	162,2±14,1	1,0±1,0	3,3±0,6	11,7±1,2	11,7±2,3
	1,0	78,0±5,4	120,8±4,9	2,6±0,6	2,3±0,6	9,7±1,4	5,8±1,2
	5,0	23,4±0	23,4±0	1,3±1,2	0,3±0,6	3,1±1,8	0,4±0
Mazutas	0,5	93,6±2,3	123,2±25,8	1,3±0,6	0,2±0,5	0,4±0	0,4±0
	1,0	70,2±2,3	100,6±14,2	1,3±0,6	0,7±0,6	0,8±0	0,8±0
	5,0	59,2±10,8	39,0±3,6	n/s	n/s	0,8±0	1,9±0,7

Pastaba: n/s – nepavyko suskaičiuoti dėl didelio paviršinio mazuto kiekio.

NOM (suminis – bakterijos+mielės+mikromicetai), skaičius (ksv x 10⁴), 6 ir 13 terpėje, kai panaudota skirtingi naftos produktai ir skirtingos jų koncentracijos:

Anglies šaltinis	Naftos produkto koncentracija, %	NOM skaičius (ksv x 10 ⁴)	
		Terpė Nr 6	Terpė Nr. 13
Dyzelinas	0,5	37,4	125,6
	1,0	27,9	173,7
	5,0	12,4	44,7
Nafta	0,5	129,7	177,0
	1,0	90,3	128,9
	5,0	27,8	24,1
Mazutas	0,5	95,3	123,8
	1,0	72,3	102,1
	5,0	60,0	40,9

7 pavyzdys. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų (NOM) siūloma naujos sudėties Liučino-GVT terpė:

makroelementai druskų pavidalu, g/l:

NaNO ₃	3,0
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,1
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,02

Mikroelementai druskų pavidalu, g/l:

ZnSO ₄ x 6H ₂ O	0,005
MnSO ₄ x 4H ₂ O	0,005
KJ	0,005
H ₃ BO ₄	0,005
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 7H ₂ O	0,005
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,001
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,001

vitaminai, mg/l:

tiaminas (B ₁)	0,2
riboflavinas (B ₂)	0,2

pantoteno rūgštis (B ₅)	0,2
nikotino rūgštis (PP)	0,2
piridoksinas (B ₆)	0,2
EDTA (etilendiamintetraaceto rūgštis)	0,15 g/l
Alaus misa	5,0 ml/l
Nafta (arba dyzelinas)	1,0–5,0 ml/l
Sojos miltai	5,0 g/l
Sacharozė (arba melasa)	2,0–10,0 g/l
Vanduo	1000 ml

Terpės tinkamumui įvertinti sudaryti tokie 4 variantai (terpėje panaudota 1,0 ml/l naftos ir sacharozės 2,0 g/l):

- A. Pilna sterili terpė,
- B. Pilna nesterili terpė,
- C. Vietoje vitaminų į terpę dedama tik 5,0 ml alaus misos; ir
- D. Terpė be vitaminų, sojos miltų, sacharozės, paliekant alaus misos 5,0 ml/l.

Kontroliniu variantu (prototipas) panaudota stabili, plačiai naudojama Bushnell-Haas terpė (jos sudėtis parodyta 4 pavyzdyje, tik šiame bandyme vietoje 0,5 g/l angliavandenilių – terpė Nr. 3 bei 10 % naftos produktų – terpė Nr. 13, į šią tyrimo terpę įterpta 1,0 ml/l naftos).

Naftą oksiduojančių mikroorganizmų skaičius ($\text{ksv} \times 10^4$), išskirtas iš naftos produktais užteršto grunto ant naujosios universalios mitybinės terpės ir nurodytų variantų. Rezultatai pateikiami lentelėje:

Terpės variantas	Bakterijos	Mielės	Mikromicetai
A	214,1±22,4	2,4±0,0	5,1±0,7
B	185,1±16,5	1,6±0,7	11,4±1,4
C	149,0±2,7	0,8±0,7	3,5±1,2
D	77,6±2,4	2,0±0,7	3,1±1,4
Kontrolė Bushnell-Haas terpė	78,4±2,7	1,2±0,0	4,3±2,4

Gauti rezultatai rodo, kad naujoji terpė beveik 3 kartus yra efektyvesnė nei kontrolinė Bushnell-Haas terpė. Kai terpėje sumažinamas karbohidratų, kaip anglies šaltinio (sojos miltai, sacharozė) kiekis bei terpėje nėra vitaminų, jos efektyvumas smarkiai sumažėja (D variantas) ir prilygsta kontrolei.

Atlikti bandymai akivaizdžiai parodo, kad tokios sukurtos kompozicijos NOM mitybinė terpė (jos sudėtis pateikiama 7 pavyzdyje) užtikrina naftą oksiduojančių mikroorganizmų (įvairių bakterijų, mieliagrybių, mikromicetų rūšių), pasižyminčių skirtingomis fiziologinėmis-biocheminėmis savybėmis, gerą vystymąsi ir yra tinkamas taršos naftos produktais indikatorius.

Didelis siūlomos Liužino-GVT terpės privalumas bei pranašumas, kad ją sudarančiais veiksniais (C:N:P:K santykis, atitinkamos koncentracijos 7 mikroelementų, 5 vitaminų panaudojimas, kompleksono EDTA įvedimas į terpę, pH reguliavimas) užtikrinamas terpės stabilumas. Ją sudarantys ingredientai, jų kiekiai ir tarpusavio sąveika pilnai atitinka įvairius NOM fiziologinių grupių mitybinius reikalavimus ir gali būti efektyviai naudojama aplinkos užterštumo nafta ir jos produktais lygiui įvertinti, naftą oksiduojančių mikroorganizmų atrankai, naujų naftos telkinių paieškai.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų terpės gavimo būdas, kai į ją įneša naftos produktus, pagrindinius biogeninius mitybos elementus, mikroorganizmus kultivuoja aerobinėmis sąlygomis esant palankiam temperatūros režimui, besiskiriantis tuo, kad į terpę įdeda naftą ir karbohidratus kaip anglies šaltinį, subalansuoja anglies, azoto, fosforo, kalio tarpusavio kiekius, įterpia mikroelementus, vitaminus, kompleksonus, svarbius naftą skaidančių mikroorganizmų veiklai intensyvinti.
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad kaip anglies šaltinį naudoja naftą 1,0–5,0 ml/l ir sacharozę 2,0–10,0 g/l.
3. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad sudaryti buferiniam tirpalui, palaikančiam terpės vandenilio jonų koncentraciją pH lygią 7, fosforo šaltiniu naudoja KH_2PO_4 0,9–1,0 g/l ir K_2HPO_4 0,4–0,5 g/l.
4. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad palaiko optimalų terpės C:N:P:K santykį, atitinkantį mikroorganizmų ląstelės elementų sudėtį, kuris sudaro 100:5-7:1:1.
5. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad į terpę įveda cinko (Zn), mangano (Mn), jodo (J), boro (B), molibdeno (Mo) mikroelementus, kiekvieno 0,004–0,005 g/l koncentracijos ir vario (Cu), kobalto (Co) mikroelementus, kiekvieno maždaug 0,001 g/l koncentracijos.
6. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad į terpę įdeda vitaminus, tokius kaip tiaminą (B_1), riboflaviną (B_2), pantoteno rūgštį (B_5), nikotino rūgštį (PP), piridoksiną (B_6), kiekvieno jų ne daugiau kaip 0,2 mg/l.
7. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad į terpę įterpia kompleksoną EDTA maždaug 0,15 g/l, kuris sudaro kompleksinius junginius su mikroelementais ir taip pašalina jų iškritimą ir nusėdimą.

8. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad naftą oksiduojančių mikroorganizmų grupes, platus jų spektras, kultivuoja agarizuotoje terpėje 23–26°C temperatūroje, geriau 25–26°C temperatūroje.

9. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų terpė, apimanti naftos produktus, pagrindinius biogeninius mitybos elementus, azotą, fosforą, kalį, magnį, kalcį, besiskirianti tuo, kad Liužino-GVT terpės turinį sudaro: nafta – 1,0–5,0 ml/l, sacharozė (arba melasa) – 2,0–10,0 g/l, sojos miltai – 5,0 g/l, alaus misa – maždaug 5,0 ml/l, makroelementai druskų pavidalu: NaNO_3 – 3,0 g/l, KH_2PO_4 – 0,9–1,0 g/l, K_2HPO_4 – 0,4–0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 g/l, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 g/l, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02 g/l; mikroelementai druskų pavidalu: $\text{ZnSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, KJ, H_3BO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 7\text{H}_2\text{O}$, kiekvieno jų ne daugiau kaip po 0,005 g/l; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, kiekvieno jų ne daugiau kaip po 0,001 g/l; vitaminai: tiaminas (B_1), riboflavinai (B_2), pantoteno rūgštis (B_5), nikotino rūgštis (PP), piridoksinas (B_6), kiekvieno jų ne daugiau kaip po 0,2 mg/l; kompleksonas EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis) – maždaug 0,15 g/l ir vanduo iki 1000 ml.