

(11) Patento numeris: **6625** (51) Int. Cl. (2019.01): **B09C 1/00**

(21) Paraiškos numeris: **2017 079**

(22) Paraiškos padavimo data: **2017-10-13**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2019-04-25**

(45) Patento paskelbimo data: **2019-05-27**

(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:

Stanislav BALION, LT
Arnoldas JURYS, LT
Martynas PAŠKEVIČIUS, LT

(73) Patento savininkas:

UAB „BIOVERSIJA“, Akademijos g. 7, 08412 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Martynas PAŠKEVIČIUS, Visorių g. 16-64, 08300 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Bakterinis preparatas, skirtas naftos produktų oksidacijai, ir jo panaudojimas

(57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su biologiniu angliavandenilių skaidymu dirvožemyje. Šiuo tikslu naudojamas biopreparatas, kurio sudėtyje yra nepatogeninė bakterija *Acinetobacter calcoaceticus* BT8, gebanti skaidyti angliavandenilius bei, papildomai, fiksuoti ore esantį azotą ir panaudoti jį kaip mineralinę medžiagą. Biopreparato kiekis ir mineralinė sudėtis yra parenkami atsižvelgiant į valomame grunte esančių naftos teršalų koncentraciją.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su naftą skaidančio mikroorganizmo kompozicija ir jos panaudojimu naftos, ir jos darinių utilizavimui iš užteršto grunto.

Technikos lygis

Nafta yra sudėtingas angliavandenilių ir kitų organinių junginių mišinys. Jame yra šimtai ar tūkstančiai alifatinių, šakotų ir aromatinių angliavandenilių (Wang et al. 1998), kurių dauguma yra toksiški gyviems organizmams.

Užteršto dirvožemio valymui dažniausiai naudojami fiziko-cheminiai ir biologiniai būdai. Fiziko-cheminiai apdorojimo būdai yra deginimas, terminė desorbcija, koksavimas, tirpiklių ekstrahavimas, talpinimas į sąvartynus ir t.t. Tačiau šie būdai arba paverčia gruntą nebenaudotinu (deginimas), arba nepašalina esminės problemos (sąvartynai). Be to, Europoje, įstatymai reikalauja, kad būtų mažinamas visų sąvartynų skaičius ir kuo daugiau atliekų būtų perdirbama.

Dar 1946 m. Claude E. ZoBell atrado, kad daugelis mikroorganizmų gali naudoti angliavandenilius kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Jis taip pat nustatė, kad angliavandenilių panaudojimas labai priklauso nuo naftos mišinių sudedamųjų dalių cheminio pobūdžio ir aplinkos veiksnių (Jain et al. 2011). Mikroorganizmų panaudojimas angliavandeniliais užterštos teritorijos atkūrimui (remediacijai) yra vykdomas panaudojant naftą oksiduojančius mikroorganizmus, ypač dirvožemyje esančias vietines bakterijas ir grybus. Šie mikroorganizmai gali skaidyti daugybę naftos atliekose esančių sudedamųjų dalių (Eriksson, Dalhammar, ir Borg-Karlson 1999; Barathi ir Vasudevan 2001; Mishra et al. 2001). Nors grybai taipogi pasižymi naftą oksiduojančiomis savybėmis, tačiau jų augimas yra sąlyginai lėtas, todėl jie sunkiai pritaikomi lauko sąlygomis ir esant dideliame užterštumui (Mohsenzadeh, Chehregani Rad, ir Akbari 2012). Siekiant paspartinti biologinį skaidymą naftos produktais užterštas gruntas apdorojamas dirbtinai užaugintais naftą oksiduojančiais mikroorganizmais, kurie naftos angliavandenilius naudoja kaip maisto šaltinį ir skaido juos iki nekenksmingų medžiagų: CO₂ ir H₂O.

Acinetobacter rūšys yra plačiai paplitę ir gali būti išgaunamos iš vandens, dirvožemio, gyvų organizmų ir net iš žmogaus odos. Tai nejudrios, neigiamos oksidazės, griežtai aerobinės, gram neigiamos kokobacilos. Jos gali naudoti įvairius anglies šaltinius augimui ir gali būti auginamos palyginti paprastose terpėse, įskaitant

maistinį agarą arba triptikazės sojų agarą (Abdelhaleem 2003). *Acinetobacter* genties bakterijos dėl savo įvairovės gamina daugybę medžiagų naudojamų biotechnologijose. Kai kurios *Acinetobacter* rūšys gamina didelius kiekius polisacharidų, poliesterių ir lipazių. Tačiau industriniu požiūriu svarbiausi yra emulsikliai, tokie kaip, pvz., emulsinas (Gutnick et al. 1980), OmpA (Walzer, Rosenberg, ir Ron 2006) ar alanas (Toren et al. 2002). Emulsikliai ypač naudingi angliavandenilių skaidyme, nes padeda emulguoti naftą ir jos darinius, taip paspartindami degradavimo procesus. Jau prieš porą dešimtmečių buvo pastebėta, kad kai kurios *Acinetobacter* rūšys geba skaidyti naftą ir jos darinius, tačiau geri rezultatai buvo pasiekiami tik laboratorinėmis sąlygomis, dėl naftos inhibicinių savybių bei aeracijos trūkumo dirvoje bei skystoje terpėje (Hanson et al. 1997). Visų mikroorganizmų augimui ir dauginimuisi yra būtinos ne tik maisto medžiagos, bet ir mikroelementai, tokie kaip azotas, kalis, fosforas, siera, magnis, kalcis ir tt. Kai kurie iš jų - gyvybiškai svarbūs, nes yra DNR sudėtyje (azotas, fosforas), amino rūgščių sudėtyje (azotas, siera) ir ląstelių sienelėse (fosforas, kalcis).

Tačiau mikroelementai taip pat gali įtakoti įvairių naftos komponentų bioremediaciją. Aromatinių angliavandenilių biologinis skaidymas yra ypač jautrus pH pokyčiams. Foght ir kt. 1999 m. ištyrė azoto šaltinio vaidmenį naftos komponentų biologiniam skaidymui esant šaltoms jūrinėms sąlygoms (10 °C). Nitratai neturėjo įtakos pH, tačiau amonio pokyčiai lėmė rūgštėjimą, dėl kurio susilpnėjo aromatinių junginių skaidymas (Margesin ir Schinner 2001). Tokie rezultatai rodo, kad labai svarbu tinkamai adaptuoti sąlygas, kuriose mikroorganizmai skaido teršalus ir nuolat stebėti tų sąlygų pokyčius. Dėl nepastovių oro sąlygų ir nevykdant stebėjimų, daugelis bakterinių preparatų neveikia taip kaip yra tikimasi atlikus tik laboratorinius eksperimentus. Taigi daug su naftos biologiniu skaidymu susijusių išradimų yra nepritaikomi praktiškai arba veikia tik uždaromis ir kontroliuojamomis sąlygomis ir negali būti pritaikyti dideliems užteršto grunto plotams.

Išradimo esmė

Bakterinio preparato skaidančio naftos teršalus, apimančio *Acinetobacter calcoaceticus* BT 8 mikroorganizmus, panaudojimo technologija yra pagrįsta bakterijų, atrinktų iš dirvožemio, kultivavimu ir jų panaudojimu naftos degradacijai. Šis išradimas paspartina dirvožemio valymo procesą ir yra pranašesnis už kitus pramoniniu būdu gaminamus preparatus kadangi panaudojamas mikroorganizmo gebėjimas fiksuoti ore esantį azotą, taip sumažinant pridėtinių trąšų poreikį.

Detalus išradimo aprašymas

Šiame išradime aprašomas naujas bakterinis preparatas gebantis efektyviai, saugiai ir pigiai oksiduoti naftos teršalus dirvožemyje ir paversti juos nekenksmingomis cheminėmis medžiagomis. Sukurtas bakterinis preparatas pasižymi mažesniu mineralinio azoto poreikiu, nes jame naudojama bakterija *A. calcoaceticus* BT 8 geba fiksuoti ore esantį dujinį azotą ir versti jį mineraline medžiaga reikalinga įvairių gyvybinių funkcijų palaikymui.

Viename išradimo įgyvendinimo pavyzdyje naudojamas bakterinis preparatas susidedantis iš atrinktų *A. calcoaceticus* BT 8 bakterijų ir mineralinių trąšų, kurios neapima azoto. Šis preparatas buvo išbandytas laboratorinėmis sąlygomis, kur naftos teršalų koncentracija buvo 181 g/kg.

Dar viename išradimo įgyvendinimo pavyzdyje naudojamas bakterinis preparatas susidedantis iš atrinktų *A. calcoaceticus* BT 8 bakterijų ir mineralinių trąšų apimančių azotą. Preparatas buvo išbandytas laboratorinėmis sąlygomis, kur naftos teršalų koncentracija buvo 181 g/kg.

Dar viename išradimo įgyvendinimo pavyzdyje bakterinis preparatas yra naudojamas specializuotu būdu, po auginimo užšaldant bakterinį preparatą ir jį atšildant tik prieš purškimą ant nafta užterštos dirvos, kai preparato bei mineralinių trąšų kiekiai yra parenkami pagal dirvos užterštumo laipsnį bei numatomas papildomo purškimo grafikas.

Brėžinių paveikslų aprašymas

1 pav. Parodytas naftos angliavandenilių kiekis po mėnesį trukusio laboratorinio eksperimento, kai pradinis teršalų kiekis buvo 181 g/kg. Palyginamas biopreparato poveikis su mineralinio azoto šaltiniu ir be jo.

2 pav. Parodytas naftos angliavandenilių skaidymas lauko sąlygomis, kai pradinė naftos koncentracija - 189 g/kg. Eksperimento trukmė – 8 sav.

Priemonės ir metodai

Prietaisai: techninės svarstyklės KERN PCB 2500, analitinės svarstyklės KERN ABJ 220, laminarinė oro srauto spinta „Thermo Scientific“, termostatuojama purtyklė „Thermo Scientific“ MaxQ 4450, termostatuojamas mikroorganizmų

inkubatorius „Thermo Scientific“ Heratherm IGS60, fermentatorius EDF-5.4_1 „Biotechniskais centrs“, autoklavas AL02-10 „Advantage-Lab“, spektrofotometras GENESYS 10S UV-Vis „Thermo Scientific“.

Reagentai:

1 Lentelė. Bakterinio preparato gamyboje naudojami reagentai.

Eil. nr	Regentas	CAS numeris	Formulė	Gamintojas
1.	Mitybinė terpė	CM001B	-	Oxoid
2.	Bakteriologinis agaras	LP011B	-	Oxoid
3.	Dyzelinas	-	-	Statoil
4.	Rektifikuotas spiritas	-	-	Vilniaus Degtinė
5.	Di-amonio hidrofosfatas	7783-28-0	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Fisher Scientific
6.	Amonio chloridas	12125-02-9	NH_4Cl	Acros Organics
7.	Kalio dihidrofosfatas	7778-77-0	KH_2PO_4	Fisher Scientific
8.	Di-kaliohidrofosfatas	7758-11-04	K_2HPO_4	Fisher Scientific
9.	Mangano sulfatas	7785-87-7	MnSO_4	Roth
10.	Moro druska	7783-85-9	$\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)\text{SO}_4$	Fisher Scientific
11.	Kalcio chloridas	10043-52-4	CaCl_2	Fisher Scientific
12.	Gliukozė	492-62-6	-	Acros Organics
13.	Natrio chloridas	7647-13-5	NaCl	Fisher Scientific
14.	Dejonizuotas vanduo	III vandens kokybės lygis	-	-
15.	Vandentiekio vanduo	-	-	-
16.	Natrio šarmas	1310-73-2	NaOH	Sigma-aldrich
17.	Fosforo rūgštis	13598-36-2	H_3PO_4	Sigma-aldrich
18.	Kalio permanganatas	7722-64-7	KMnO_4	Fisher Scientific
19.	Techninis aliejus	-	-	Sanitex
20.	Maistinis cukrus	-	-	Sanitex
21.	Melasa	-	-	Sanitex

Metodai:

Mikroorganizmų atranka

Siekiant sukurti bakterinį preparatą naftos teršalų valymui dirvožemyje buvo naudojamas selektyvios atrankos metodas išgaunant mikroorganizmus iš angliavandeniliais užteršto dirvožemio mėginių. Mėginiai buvo imti iš seno garažo automobilių remonto dirbtuvių, paėmus naftos produktais užteršto šlamo pavyzdžių. Norimų izoliatų išskyrimas buvo atliekamas ant agarizuotos terpės auginant iš mėginių išskirtus mikroorganizmus, kai vienintelis anglies šaltinis terpėje buvo angliavandeniliai. Sėkmingiausiai augę mikroorganizmai buvo naudojami kituose eksperimentuose.

Azotą fiksuojančių mikroorganizmų atranka

Išskirti naftą oksiduojantys izoliatai buvo auginami ant agarizuotos terpės, be azoto šaltinių. Eksperimento metu išaugo tik tie naftą oksiduojantys izoliatai, kurie gebėjo fiksuoti ore esantį dujinį azotą ir versti jį mineraline medžiaga reikalinga įvairių gyvybinių funkcijų palaikymui.

Mikroorganizmų rūšies nustatymas

Siekiant patvirtinti išskirto mikroorganizmo rūšį jis buvo identifikuojamas BASECLEAR laboratorijoje Olandijoje. Mikroorganizmas buvo identifikuotas panaudojant validuotą MicroSeq sistemą iš „Applied Biosystems“. Ši automatinė sistema yra paremta bakterinio 16S rRNR geno PGR amplifikacija ir DNR sekoskaita. Buvo nustatyta *A. calcoaceticus* BT8 16S rRNR geno seka - SEQ ID Nr. 1:

GATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGTGA
TGGTGyTTGCACTATCACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTG
CCTATTAGTGGGGGACAACATTTGAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTA
CGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCG
GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGT
CTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGG
CTACTGAAGTTAATACCTTCAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGG

CTAACTCTGT.

Nustatyta, jog geno seka 99,94 % sutampa su laboratorijoje naudojamose duomenų bazėje esančia *A. calcoaceticus* 16S rRNR geno seka. Rūšies nustatymas patvirtino, jog mūsų išskirta bakterija yra nepatogeninė ir tinkama naudojimui dirvožemio bioremediacijoje.

A. calcoaceticus BT 8 biopreparato paruošimas

Norint užtikrinti, kad *A. calcoaceticus* BT8 bus veiksmingas lauko sąlygomis, mikroorganizmas kultivuojamas paprastoje mitybinėje terpėje su sumažintu mineralinio azoto kiekiu, aerobinėmis sąlygomis. Auginimo pabaigoje biopreparatas yra paruošiamas užšaldymui -18 °C temperatūroje, pridedant 10 % (pagal tūrį) melasos. Kultūrinis skystis su melasa gerai išmaišomas, išpilstomas ir užšaldomas.

Biopreparato panaudojimo pavyzdžiai

Čia nurodomi bakterinio preparato panaudojimo pavyzdžiai. Išradimas nėra ribojamas šiais pavyzdžiais.

1 pavyzdys

Išaugintas ir užšaldytas *A. calcoaceticus* BT8 preparatas laboratorinėmis sąlygomis buvo atšildytas, atskiestas su vandeniu papildytu mineralinėmis trąšomis (P, K) ir po 50 ml išpilstytas į 1 L tūrio indus su nafta užterštu gruntu. Indai buvo laikomi kambario temperatūroje (~22 °C) mėnesį laiko. Kiekvieną savaitę gruntas buvo permaišomas ir papildomai užpilami skirtingi kiekiai biopreparato bei vandens. Kas savaitę buvo matuojamas angliavandenilių kiekis grunte. Eksperimento sąlygos pateikiamos 2 lentelėje.

2 lentelė

Indo numeris	1	2	3	4
Pradinis naftos kiekis g/kg	181	181	181	181
Biopreparato kiekis ml	0,5	1	2	5
Vandens kiekis ml	49,5	49	48	45
Galutinis naftos kiekis g/kg	101	91	84	93

2 pavyzdys

Išaugintas ir užšaldytas *A. calcoaceticus* BT8 preparatas laboratorinėmis sąlygomis buvo atšildytas, atskiestas su vandeniu papildytu mineralinėmis trąšomis

(N, P, K) ir po 50 ml buvo išpilstytas į 1 L tūrio indus su nafta užterštu gruntu. Indai buvo laikomi kambario temperatūroje (~22 °C) mėnesį laiko. Kiekvieną savaitę gruntas buvo permaišomas ir papildomai užpilami skirtingi kiekiai biopreparato bei vandens. Kas savaitę buvo matuojamas angliavandenilių kiekis grunte. Eksperimento sąlygos pateikiamos 3 lentelėje.

Šio eksperimento metu nustatyta, kad į terpę pridėjus papildomą azoto šaltinį angliavandenilių skaidymas pasikeitė nežymiai. Pirmo ir antro pavyzdžių rezultatų palyginimas pateikiamas 1 pav.

3 lentelė

Indo numeris	1	2	3	4
Pradinis naftos kiekis g/kg	181	181	181	181
Biopreparato kiekis ml	0,5	1	2	5
Vandens kiekis ml	49,5	49	48	45
Galutinis naftos kiekis g/kg	99	88	80	94

3 pavyzdys

Išaugintas ir užšaldytas *A. calcoaceticus* BT8 preparatas prieš naudojimą buvo atšildytas ir po 1 L buvo išpilstytas ant 4 m² ploto dirvos, kuri buvo užteršta naftos produktais (189 g/kg). Preparatas buvo skiedžiamas su mineralinėmis trąšomis (P, K, N) papildytu vandeniu santykiu 1:20. Azoto kiekis mineralinių trąšų mišinyje buvo sumažintas iki 50 mg/kg užteršto grunto. Pusė praskiesto biopreparato buvo išpurškiama ant ~30 cm sluoksnio storio sukasto grunto, po išpurškimo gruntas vėl sukasamas ir išpurškiama antra biopreparato dalis. Kiekvieną savaitę gruntas buvo permaišomas ir papildomai užpilama biopreparato bei vandens. Kas savaitę buvo matuojamas angliavandenilių kiekis grunte. Lauko eksperimentas truko 2 mėn. Eksperimento sąlygos pateikiamos 4 lentelėje.

4 lentelė

Savaitė	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Naftos angliavandenilių konc. g/kg	189	165	143	119	90,6	79,7	69,6	53,2	41,3

Šis eksperimentas parodė jog, naudojant mūsų išradimą, efektyviam angliavandenilių skaidymui lauko sąlygomis reikalingi mažesni azoto trąšų kiekiai.

Optimalios mūsų sukurto bakterinio preparato veikimo sąlygos bei paaiškinimai pateikti 5 lentelėje.

5 Lentelė. Optimalūs bakterinio preparato parametrai.

Parametras	Ribos	Paaiškinimai
Naftos produktų koncentracija, g/kg	1-300	Naftos produktų koncentracija neturi didelės įtakos naftos angliavandenilių skaidymo efektyvumui
Naftą oksiduojantys mikroorganizmai, KSV/g	$\geq 10^6$	Esant mažesniai titrai gruntas papildomai apdorojamas biologiniu preparatu
Drėgmė, %	35-60	<35 – reikalingas papildomas laistymas vandeniu >60 – reikalingas dažnesnis grunto vartymas
Ortofosfatai, mg/kg	1000-3000	Esant ortofosfatų trūkumui papildomai įdedamas apskaičiuotas trąšų kiekis
pH	5,7-8,2	pH koreguojamas 0,1 % NaOH/H ₃ PO ₄ vandeniniu tirpalu

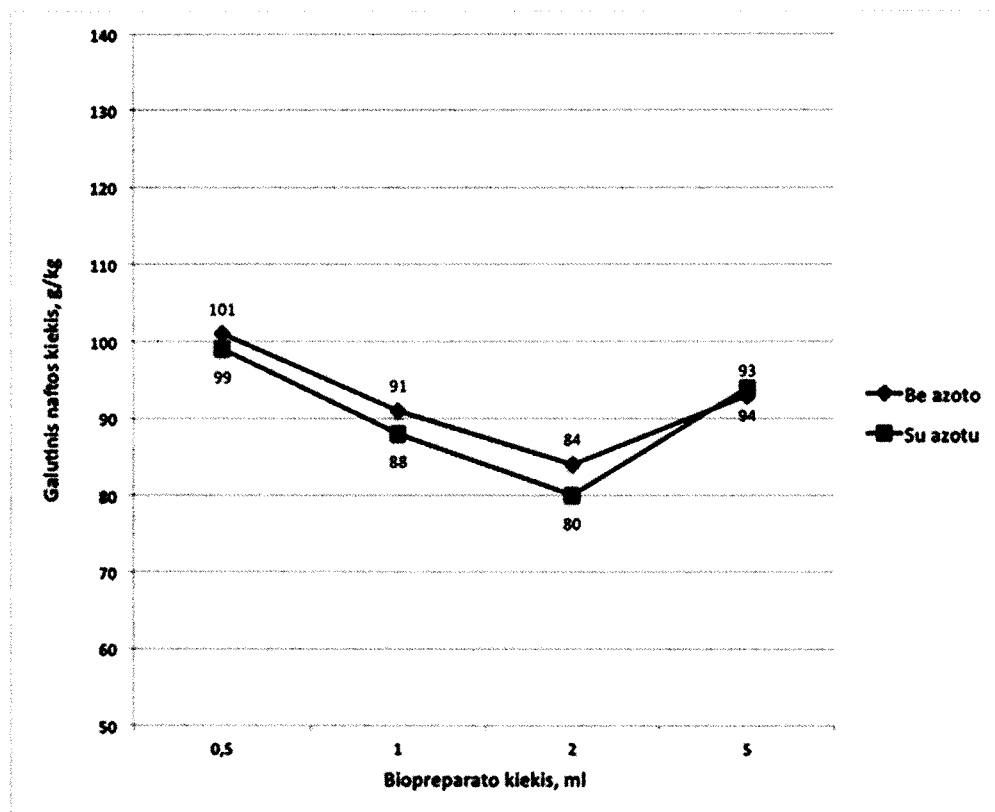
Literatūra

1. Abdelhaleem, Desouky. 2003. *Acinetobacter: Environmental and Biotechnological Applications*. T. 2.
2. Barathi, S., ir N. Vasudevan. 2001. „Utilization of Petroleum Hydrocarbons by *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from a Petroleum-Contaminated Soil.“ *Environment International* 26 (5-6): 413–16.
3. Eriksson, M., G. Dalhammar, ir A. K. Borg-Karlson. 1999. „Aerobic Degradation of a Hydrocarbon Mixture in Natural Uncontaminated Potting Soil by Indigenous Microorganisms at 20 Degrees C and 6 Degrees C.“ *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (4): 532–35.
4. Gutnick, DL, EA Bayer, C Rubinovitz, O Pines, Y Shabtai, ir E Rosenberg. 1980. „Emulsan production in *Acinetobacter* RAG-1“. *Adv. Biotechnol* 11: 455–59.
5. Hanson, K. G., A. Nigam, M. Kapadia, ir A. J. Desai. 1997. „Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* Sp. A3.“ *Current Microbiology* 35 (3): 191–93.
6. Jain, PK, VK Gupta, RK Gaur, M Lowry, DP Jaroli, ir UK Chauhan. 2011. „Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water“. *Research journal of environmental toxicology* 5 (1): 1.
7. Margesin, R., ir F. Schinner. 2001. „Biodegradation and Bioremediation of Hydrocarbons in Extreme Environments.“ *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (5-6): 650–63.
8. Mishra, S., J. Jyot, R. C. Kuhad, ir B. Lal. 2001. „Evaluation of Inoculum Addition to Stimulate in Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil.“ *Applied and Environmental Microbiology* 67 (4): 1675–81. doi:10.1128/AEM.67.4.1675-1681.2001.
9. Mohsenzadeh, Fariba, Abdolkarim Chehregani Rad, ir Mehrangiz Akbari. 2012. „Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils“. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 9 (1): 26. doi:10.1186/1735-2746-9-26.

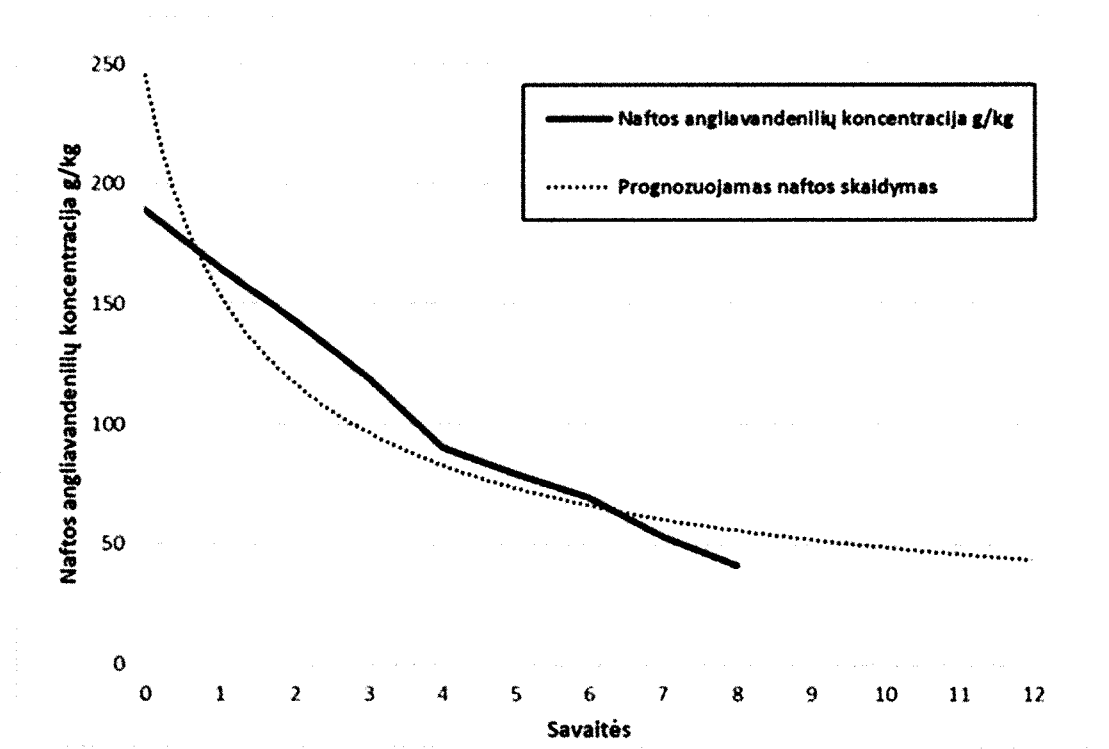
10. Toren, Amir, Elisha Orr, Yossi Paitan, Eliora Z. Ron, ir Eugene Rosenberg. 2002. „The Active Component of the Bioemulsifier Alasan from *Acinetobacter Radioresistens* KA53 Is an OmpA-like Protein.“ *Journal of Bacteriology* 184 (1): 165–70.
11. Walzer, Gil, Eugene Rosenberg, ir Eliora Z. Ron. 2006. „The *Acinetobacter* Outer Membrane Protein A (OmpA) Is a Secreted Emulsifier.“ *Environmental Microbiology* 8 (6): 1026–32. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.00994.x.
12. Wang, Z., M. Fingas, S. Blenkinsopp, G. Sergy, M. Landriault, L. Sigouin, J. Foght, K. Semple, ir D. W. Westlake. 1998. „Comparison of Oil Composition Changes due to Biodegradation and Physical Weathering in Different Oils.“ *Journal of Chromatography. A* 809 (1-2): 89–107.

Išradimo apibrėžtis

1. Bakterinis preparatas, skirtas naftos produktų oksidacijai, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo, kad naudojami *Acinetobacter calcoaceticus* BT 8 mikroorganizmai ir papildomi mikroelementai, reikalingi mikroorganizmų augimui ir vystymuisi, kur *A. calcoaceticus* BT 8 mikroorganizmai vykdo ore esančio azoto fiksaciją.
2. Bakterinis preparatas pagal 1 punktą, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo, kad mikroelementai yra parinkti iš grupės susidedančios iš fosforo, kalio ir azoto.
3. Bakterinis preparatas pagal 1-2 punktus, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo, kad azoto kiekis biopreparate yra iki 50 mg/kg užteršto grunto.
4. Bakterinis preparatas pagal 1-3 punktus, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo, kad *A. calcoaceticus* 16S rRNR seka yra bent 99 % identiška SEQ ID Nr. 1.
5. Bakterinis preparatas pagal 1-4 punktus, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo, kad pagamintas preparatas iki naudojimo yra užšaldomas.
6. Bakterinio preparato pagal 1-5 punktus panaudojimas naftos teršalų skaidymui dirvožemyje.
7. Bakterinio preparato panaudojimas pagal 6 punktą, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo, kad teršalų skaidymo paspartinimui naudojama dirvožemio aeracija ir drėkinimas.
8. Bakterinio preparato panaudojimas pagal 6-7 punktus, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo, kad bakterinis preparatas yra purškiamas ant dirvožemio 2 kartus per savaitę.



1 pav.



2 pav.