

BacilSoil

Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego i nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania gleby i poprawy jej właściwości biologicznych przy jednoczesnym kontrolowaniu patogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego i nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania gleby oraz utrzymania i/lub poprawy właściwości biologicznych (zdrowia) gleby zapewniający utrzymanie i/lub poprawę i/lub ochronę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich wykazujący cechy biostymulacji roślin, zawierający szczepy bakteryjne *Bacillus* spp., a także składniki nośnika, w tym serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną, otręby pszenne korzystnie durum, suche kwasy humusowe, mielone nasiona gorczycy, olej rzepakowy oraz olejek goździkowy, który stosuje się w formie sypkiej albo w postaci peletu albo po zastąpieniu serwatki, otrąb i oleju rzepakowego dolomitem mikronizowanym lub maltodekstryną w postaci oprysku przygotowanego z postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie lub rozpuszczalnej w wodzie.

Bakterie z rodzaju *Bacillus* są grupą mikroorganizmów, wśród których występują szczepy posiadające właściwości promujące wzrost i rozwój roślin, stąd należą do intensywnie badanych drobnoustrojów o dużym potencjale wykorzystania w ogrodnictwie. Warto wspomnieć, że przedstawiciele tego rodzaju należą do mikroorganizmów zasiedlających różne nisze ekologiczne, występują niemal we wszystkich typach gleb, a także charakteryzują się dużą tolerancją na stresy środowiskowe, w tym wysokie temperatury. Bakterie z rodzaju *Bacillus* należą do mikroorganizmów przetrwalnikujących, a także szybko się namnażają w płynnych podłożach hodowlanych.

W obecnym stanie wiedzy opisano, że wśród bakterii z rodzaju *Bacillus* występują szczepy, które stymulują wzrost i rozwój roślin, dzięki produkcji różnych metabolitów, charakteryzują się wysoką aktywnością enzymatyczną i metaboliczną, która jest przydatna w transformacji materii organicznej, a także posiadają zdolności antagonistyczne wobec mikroorganizmów potencjalnie fitopatogenicznych, jednakże cechy te nie należą do oczywistych i wyodrębnienie odpowiednich szczepów wymaga szeregu badań. Poniżej przedstawiono kilka przykładów wykorzystania szczepów *Bacillus* spp. do zastosowań w rolnictwie i ogrodnictwie.

Przykładem wykorzystania szczepów z rodzaju *Bacillus* jest preparat zawierający przetrwalniki szczepu *Bacillus amyloliquefaciens* (NRRL B-50349), który efektywnie ograniczał wzrost fitopatogenów grzybowych takich jak: *Aspergillus niger*; *Bremia lactucae*, *Erisphe necator*, *Rhizoctonia Solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Septoria apicola*, *Spatherotheca fulignea*, *Spatherotheca macularis* (Snyder A., Vance J., Gnanmanickam S., *Bacillus amyloliquefaciens* strain, 2016, US Patent: US 9234251 B2).

Znane jest również wykorzystanie w ochronie roślin szczepów *Bacillus methylotrophicus* XT1 oraz XT2 o aktywności antagonistycznej w stosunku do *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* i *Phytophthora cactorum* (Bejar Luque M.V., Llamas Company, Inmaculada, Ruiz Garcia C., Quesada Arroquia E., *Use of Bacillus methylotrophicus as a stimulant of plant growth and biological control means, and isolates of said species*, 2016, CA Patent: CA 2991678 A1). Szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis* zostały także wykorzystane jako komponenty preparatu nicieniobójczego (Abilio A., Knap I., De Freitas Zambelli L.S., *Kompozycja nicieniobójcza zawierająca Bacillus subtilis i Bacillus licheniformis*, EP2603086).

Izolaty *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) o wysokiej aktywności celulolitycznej zostały wykorzystane jako komponenty preparatu do mineralizacji materii organicznej, w którym bakterie te osadzone są na nośniku w postaci minerału glinokrzemianowego (Ciecierski W., Kardasz H., Szychowska K., Wilk R., *Preparat mikrobiologiczny do mineralizacji materii organicznej zawierającej celulozę, zwłaszcza odpadów poźniwnych oraz zastosowanie preparatu mikrobiologicznego w uprawie roślin*, Pat.230762).

Badania nad rozwojem ekologicznych technik uprawy roślin sadowniczych koncentrują się m.in. na analizie różnorodności biologicznej mikroorganizmów w środowisku glebowym i zmianach intensywności procesów zachodzących w ryzosferze czy stosowaniu bioproduktów w celu ochrony roślin przed patogenami grzybowymi i szkodnikami (Frąc, M., Hannula, E.S.,

Belka, M., Salles, J.F., Jedryczka, M., 2022. Soil mycobiome in sustainable agriculture. Front. Microbiol. 13:1033824. 10.3389/fmicb.2022.1033824). W rolnictwie ekologicznym dopuszcza się stosowanie nawozów naturalnych i substancji poprawiających właściwości gleby. Są to produkty nieorganiczne i organiczne, które są przyjazne dla środowiska i ludzi (*EASAC, 2022. Regenerative agriculture in Europe: A critical analysis of contributions to European Union Farm to Fork and Biodiversity Strategies. European Academies Science Advisory Council, policy report 44, April 2022, pp. 1-70, ISBN: 978-3-8047-4372-4, www.easac.eu*). Na rynku europejskim dostępne są nawozy organiczne oraz substancje do poprawy właściwości gleb produkowane na bazie ekstraktów roślinnych oraz kompostu. Bioprodukty na bazie wyciągów z roślin zawierają coraz częściej dodatek pożytecznych mikroorganizmów, które wykorzystywane są również do zwalczania chorób i szkodników (*Pylak M., Oszust K., Frąc M. (2019). Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. Rev Environ Sci Biotechnol (2019) 18:597–616, https://doi.org/10.1007/s11157-019-09500-5*).

Sytuacja rolnictwa ekologicznego zmienia się dynamicznie w Polsce, Europie i na świecie, jednakże pomimo trudności wielu rolników wciąż przekształca gospodarstwa na system uprawy ekologicznej, a tendencja wzrostowa tego typu upraw obserwowana i wspierana jest również przez Unię Europejską (*European Commission. Communication from the commission to the European Parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions. A Farm to Fork Strategy for a Fair, Healthy and Environmentally-friendly Food System, 2020, ISBN 9789896540821, European Commission, Brussels, Belgium*). Jednakże liczne spotkania i rozmowy z rolnikami, a także diagnozy na podstawie badań ankietowych wskazują, że w Polsce brakuje skutecznych bioproduktów na bazie mikroorganizmów, a w szczególności z zawartością rodzimych szczepów bakteryjnych, nadających się do uprawy ekologicznej i nawożenia roślin ogrodniczych, w tym zwłaszcza dedykowanych uprawom owoców miękkich. Rolnictwo stoi przed wyzwaniem opracowania strategii zrównoważonego rozwoju, której zadaniem jest ochrona nieodnawialnych zasobów naturalnych, do których należy również gleba. W ostatnich dziesięcioleciach wiele uwagi poświęcono łagodzeniu erozji gleby poprzez fizyczne środki ochrony i dostarczanie dodatkowych składników odżywczych i wody w celu zaspokojenia potrzeb upraw. Mniej uwagi poświęcono glebie jako dynamicznemu żywemu organizmowi, chociaż jej stan ma zasadnicze znaczenie dla produkcji żywności oraz dla globalnej równowagi i funkcjonowania ekosystemu. Jakość i zdrowotność gleby determinują rozwój zrównoważonego rolnictwa, utrzymanie jakości środowiska i w konsekwencji wspieranie zdrowia roślin, zwierząt i ludzi (*Frąc, M.,*

Hannula, S.E., Belka, M., Jędrzycka, M., 2018. *Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. Front. Microbiol.* 9:707. doi: 10.3389/fmicb.2018.00707). Praktyki rolnicze, które wykorzystują duże ilości środków zewnętrznych, takich jak nawozy nieorganiczne, pestycydy i inne sztuczne środki mogą przewyciężyć specyficzne ograniczenia glebowe w produkcji roślinnej, jednak coraz częściej obserwowany jest niekorzystny wpływ tych dodatków na środowisko, co prowadzi do ciągłej degradacji środowiska, w tym utraty różnorodności biologicznej gleby. Dlatego rolnictwo zrównoważone, w tym ekologiczne jest obecnie jedną z najszybciej rozwijających się gałęzi rolnictwa na świecie, w szczególności w Unii Europejskiej (EASAC, 2022. *Regenerative agriculture in Europe: A critical analysis of contributions to European Union Farm to Fork and Biodiversity Strategies. European Academies Science Advisory Council, policy report 44, April 2022, pp. 1-70, ISBN: 978-3-8047-4372-4, www.easac.eu*).

Dlatego też nowe rozwiązania, w tym rozwój nawozowych produktów mikrobiologicznych jest potrzebny dla środowiska i oczekiwany przez rolników oraz producentów nawozów i bioproduktów w celu zmiany profilu produkcji na bardziej zielony i ekologiczny oraz w celu dostarczenia rolnikom narzędzi do produkcji zrównoważonej.

Niniejsze zgłoszenie patentowe obejmuje unikalną, opracowaną kompozycję nawozowego produktu mikrobiologicznego, w tym wyselekcjonowane szczepy mikroorganizmów, skład podłoża hodowlanego oraz składników bioproduktu, które warunkują właściwości i oryginalność opracowanego biopreparatu, stanowiąc jednocześnie zastrzeżenie patentowe.

Najczęściej patenty dotyczą biopreparatów wykorzystywanych do zwalczania patogenów roślin warzywnych i uprawnych, a brak jest rozwiązań, obejmujących nawozowe preparaty mikrobiologiczne do utrzymania i/lub poprawy właściwości mikrobiologicznych i bioróżnorodności gleby, wykazujące jednocześnie antagonistyczne oddziaływanie na kluczowe patogeny grzybowe i grzybopodobne lęgniowce, przeznaczonych również do stosowania w ekologicznej uprawie owoców miękkich, które w szczególności nadają się do przygotowania gleby pod nowozakładane plantacje poprzez kondycjonowanie gleby dzięki zastosowaniu peletowanego biopreparatu z mikroorganizmami lub jego formy sypkiej. Znane rozwiązania obejmują kontrolę pojedynczych patogenów np. z rodzaju *Botrytis*, jednak brak jest bioproduktów o kompleksowym działaniu, które są skuteczne dla czterech kluczowych fitopatogenów (*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium* spp.), utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby i wspomaganie wzrostu roślin.

Brak jest też doniesień literaturowych i patentów odnośnie peletowanych form biopreparatów zawierających mikroorganizmy oraz odnośnie łącznego zastosowania mikroorganizmów na nośnikach złożonych z serwatki w proszku, otrąb pszennych, suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy, oleju rzepakowego i olejku goździkowego, które tworzą kompozycję nawozowego produktu mikrobiologicznego do aplikacji w formie sypkiej lub peletowanej bezpośrednio pod sadzonki, ale również do gleby w celu jej kondycjonowania i przygotowania pod uprawy owoców miękkich.

Celem wynalazku jest zatem opracowanie nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania gleby oraz utrzymania i/lub poprawy jej jakości mikrobiologicznej, (zdrowia) gleby zapewniając utrzymanie i/lub poprawę i/lub ochronę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich wykazującego cechy biostymulacji roślin.

Prowadząc badania nad nawozowymi produktami mikrobiologicznymi zawierającymi szczepy z rodzaju *Bacillus*, nieoczekiwanie okazało się, że dwa z nich nie tylko wykazują właściwości antagonistyczne w stosunku do fitopatogenów *Botrytis* spp., *Verticillium* spp., *Colletotrichum* spp. i *Phytophthora* spp., ale immobilizowane na odpowiednich nośnikach wykazują wzmożone właściwości antagonistyczne w stosunku do tych patogenów roślin, wpływają na zachowanie i/lub poprawę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby, w tym jej zdrowia, jak również wykazują cechy wspomagające biostymulacyjne działanie na wzrost i rozwój roślin.

Dlatego też powyższy cel został osiągnięty poprzez opracowanie sposobu otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania gleby oraz utrzymania i/lub poprawy jej jakości mikrobiologicznej, (zdrowia) gleby zapewniając utrzymanie i/lub poprawę i/lub ochronę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich wykazującego cechy biostymulacji roślin, jak również poprzez opracowanie kompozycji nawozowego produktu mikrobiologicznego. Przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania unikalnego, zoptymalizowanego składu podłoża płynnego do hodowli bakterii, nośników i innych składników, na których immobilizowane są mikroorganizmy, które doprowadziły do uzyskania unikalnej kompozycji poszczególnych składników nawozowego produktu mikrobiologicznego,

które warunkują właściwości i oryginalność opracowanego rozwiązania, stanowiąc jednocześnie zastrzeżenie patentowe.

Istotą sposobu otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania gleby oraz utrzymania i/lub poprawy jej jakości mikrobiologicznej, (zdrowia) gleby zapewniając utrzymanie i/lub poprawę i/lub ochronę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich wykazującego cechy biostymulacji roślin, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, **jest to**, że stosuje się:

- dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na przygotowanym na wodzie podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, suszone na sypkim nośniku albo liofilizowane na sypkim nośniku;
- nośnik właściwy w postaci mieszaniny serwatki w proszku, otrąb pszennych i oleju rzepakowego dla postaci sypkiej do aplikacji posypowej lub dla postaci peletu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie;
- dodatek mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

Sposób korzystnie obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, o sekwencjach odpowiednio nr 1 i 2, wskazanych na liście sekwencji, polegający na ich hodowli na podłożu namnażającym przygotowanym na wodzie z serwatką i z mikroelementami, zawieszeniu lub suszeniu na nośniku oraz suplementacji dodatkami w postaci suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego. Szczepy bakterii namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu agarowym Plate Count Agar, w temperaturze 25-30°C przez 24-48 godzin. Następnie tak przygotowanym inokulum szczepi się płynne podłoże namnażające, w ilości 5%-15% objętości podłoża hodowlanego i prowadzi się hodowlę namnażającą w warunkach hodowli wytrząsanej w temperaturze 30°C przy 120 rpm.

Korzystnie stosuje się do hodowli bakterii inokulum o transmitancji 90%.

Hodowlę namnażającą prowadzi się korzystnie przez 48 godzin.

Korzystnie podłoże namnażające zawiera w 1 litrze: 20 g serwatki, 6,6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 0,5 g NaCl , 0,022 g CaCl_2 , 0,18 g MgSO_4 , 12,9 mg FeCl_2 , w granicach $\pm 10\%$ każdego ze składników podłoża.

Preferowanym jest, gdy dla podłoża namnażającego stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.

Korzystnie podłoże namnażające z serwatką zawiera mikroelementy: Mn, Zn, Cu, Co i Mo.

Po otrzymaniu miana hodowli namnażającej nie mniejszego niż 10^9 jtk/ml korzystnie przeprowadza się etap indukcji przetrwalnikowania, najlepiej poprzez zmianę zasolenia podłoża hodowlanego dodatkiem KCl , do uzyskania zasolenia 4% i po 48 godzinach hodowli i wytworzeniu przetrwalników przez komórki bakteryjne. Następnie hodowlę pasteryzuje się poprzez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut i otrzymaną zawiesinę przetrwalników stosuje się jako główny komponent nawozowego produktu mikrobiologicznego.

Korzystnie po zakończeniu hodowli, przygotowaną zawiesinę przetrwalników suszy się w suszarce rozpyłowej na serwatce w proszku albo poddaje się liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku, jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów.

Korzystnym jest, gdy wysuszone bakterie albo liofilizaty bakteryjne o koncentracji nie mniejszej niż 10^{11} jtk/g dodaje się w równych ilościach do uzyskania produktu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g.

W wariacie postaci sypkiej do stosowania posypowego jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę: otrąb pszennych, korzystnie durum, w ilości 80-120 g/kg produktu, oleju rzepakowego w ilości 40-60 g/kg produktu, suchych kwasów humusowych w ilości 8-12 g/kg produktu, olejku z goździka w ilości 0,1 ml/kg produktu, mielonych nasion gorczycy w ilości 8-12 g/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną, stanowiącą dopełnienie do 1 kg.

Do postaci peletu do kondycjonowania gleby przygotowaną postać sypką do stosowania posypowego poddaje się peletyzacji, korzystnie przy temperaturze wejściowej peletowanego materiału wynoszącej 25°C - 28°C oraz wilgotności peletowanego materiału mieszczącej się w granicach 4-5%.

W wariacie postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie dolomit mikronizowany jako komponent nośnika stanowi dopełnienie do 1 kg produktu.

W wariacie postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie maltodekstryna jako komponent nośnika stanowi dopełnienie do 1 kg biopreparatu.

Istota nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania gleby i poprawy jej właściwości biologicznych, przy jednoczesnym kontrolowaniu patogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazujący cechy biostymulacji roślin, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, **polega na tym**, że zawiera dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, suszone na sypkim nośniku albo liofilizowane na sypkim nośniku, nośnik właściwy w postaci mieszaniny serwatki w proszku, otrąb pszennych i oleju rzepakowego dla postaci sypkiej do aplikacji posypowej oraz dla postaci peletu biopreparatu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie, dodatek mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

Nawozowy produkt mikrobiologiczny korzystnie zawiera szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, na liście sekwencji, w równym stosunku wagowym.

Korzystnie izolaty bakteryjne wyhodowane są na podłożu namnażającym z serwatką w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.

Preferowanym jest, gdy koncentracja każdego z wysuszonych albo liofilizowanych szczepów bakteryjnych jest w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g.

W wariacie postaci sypkiej do stosowania posypowego nawozowy produkt mikrobiologiczny zawiera w 1 kilogramie 80-120 g otrąb pszennych korzystnie durum, 40-60 g oleju rzepakowego korzystnie ekologicznego, 8-12 g suchych kwasów humusowych, 8-12 g mielonych nasion gorczycy i 0,1 ml olejku z goździka, a jako nośnik wszystkich komponentów

biopreparatu zawiera serwatkę w proszku korzystnie kwaśną neutralizowaną, stanowiącą dopełnienie do 1 kg.

W innym wariantcie nawozowy produkt mikrobiologiczny ma postać peletu.

W jeszcze innym wariantcie jego postać sucha nierozpuszczalna w wodzie zawiera serwatkę sproszkowaną jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego, a dolomit mikronizowany jako nośnik stanowi dopełnienie do 1 kg.

W kolejnym wariantcie postać sucha rozpuszczalna w wodzie nawozowego produktu mikrobiologicznego zawiera maltodekstrynę jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego, a maltodekstryna jako nośnik stanowi dopełnienie do 1 kg.

Szczepy saprofitycznych bakterii glebowych z rodzaju *Bacillus* (*Bacillus subtilis* sp. AF75AB2 oraz *Bacillus* sp. AF75BC), które zawiera nawozowy produkt mikrobiologiczny zostały wyizolowane z ryzosfery roślin, są szczepami rodzimymi, pochodzącymi z kolekcji SYMBIO BANK Instytutu Ogrodnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach.

Otrzymany nawozowy produkt mikrobiologiczny w postaci sypkiej do aplikacji posypowej, w formie peletu oraz w postaci suchej nierozpuszczalnej i rozpuszczalnej w wodzie umożliwia kondycjonowanie gleby oraz utrzymanie i/lub poprawę jej bioróżnorodności mikrobiologicznej, a także ma wpływ na cechy wzrostu roślin oraz wpływa na kontrolowanie czterech istotnych patogenów owoców miękkich, w tym 3 grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* oraz 1 lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*.

Należy podkreślić, że nie ma na rynku dostępnych biopreparatów do kondycjonowania gleby, zwłaszcza w formie peletu, o potwierdzonej skuteczności pod względem utrzymania i poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby, które opierają się na analizie danych mikrobiomu ryzosfery. Analiza takich danych pozwala określić wpływ na bioróżnorodność mikrobiologiczną gleby, a analiza mikrobiomu korzeni daje możliwość oceny wpływu na bioróżnorodność mikrobiologiczną korzeni. Stąd przedstawione w niniejszym zgłoszeniu patentowym podejście jest unikatowe i innowacyjne i potwierdza korzystny wpływ opracowanego biopreparatu na środowisko glebowe i roślinę, dając podstawy dla uznania opracowanego bioproduktu za nawozowy produkt mikrobiologiczny.

Biopreparat zawierający suche kwasy humusowe, olejek z goździka oraz gorczycę mieloną przygotowany na nośniku zawierającym serwatkę w proszku korzystnie kwaśną

neutralizowaną, otręby pszenne korzystnie z pszenicy durum i olej rzepakowy korzystnie ekologiczny, nadaje się do zastosowania bezpośrednio do gleby lub pod sadzonki roślin, w formie posypowej lub po speletowaniu w formie pelletu, a także w formie do rozpuszczenia i oprysku gleby i/lub roślin, w której serwatka w proszku, otręby pszenne i olej rzepakowy zastępuje się dolomitem mikronizowanym (postać nierozpuszczalna w wodzie) lub maltodekstryną (postać rozpuszczalna w wodzie). Nawozowy produkt mikrobiologiczny w formie suchego peletu, suchych granul, umożliwia stopniowe uwalnianie składników aktywnych bezpośrednio do gleby, co znacząco wpływa na wydłużenie czasu działania biopreparatu. Dzięki takiej formie preparatu biologicznego, korzystne mikroorganizmy, komponenty preparatu mają możliwość zasiedlania środowiska glebowego równomiernie w czasie. Taka aplikacja preparatu jest również korzystniejsza w odniesieniu do różnych warunków atmosferycznych, które mogą wystąpić podczas i po aplikacji preparatu na pole uprawne i jest zalecana na etapie zakładania plantacji posypowo pod korzenie roślin oraz dogłębowo poprzez wymieszanie peletu z glebą, zapewniając utrzymanie i ochronę bioróżnorodności gleby. Natomiast forma do zawieszenia lub rozpuszczenia w wodzie i oprysku ułatwia aplikację biopreparatu na istniejącej plantacji, w kolejnych latach po jej założeniu, wpływając zarówno na jakość mikrobiologiczną gleby, parametry wzrostu roślin, jak i wzmocnienie odporności roślin na czynniki stresowe.

Opracowany biopreparat w formie suchej, peletu lub do zawieszenia w wodzie i rozpuszczalnej, stanowi kompleksową technologię kondycjonowania gleby, biostymulacji i ochrony roślin, z przeznaczeniem do zastosowania na powierzchnię gleby (forma **sucha** i pelet) oraz roślin (forma do zawieszenia w wodzie i rozpuszczalna) w uprawach owoców miękkich, głównie truskawki i maliny, w celu poprawy właściwości biologicznych (zdrowia) gleby, zapewniając utrzymanie i ochronę bioróżnorodności przy jednoczesnym kontrolowaniu groźnych patogenów roślin takich jak: *Botrytis* spp., *Verticillium* spp., *Colletotrichum* spp., i *Phytophthora* spp., i jest znamieny w swoim składzie, jak również w sposobie jego wytwarzania.

Wynalazek został uwidoczniony w przykładach wykonania na figurach, gdzie:

Fig.1 przedstawia wygląd kolonii szczepów bakteryjnych AF75AB2 i AF75BC na podłożu PCA (Plate Count Agar), hodowla 48-godzinna;

Fig.2 przedstawia profil metaboliczny szczepów bakterii będących składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego, wskazujący na stopień zużycia substratów (A 590 nm) należących do aminokwasów, alkoholi cukrowych, węglowodanów, kwasów cukrowych, pochodnych cukrowych oraz kwasów karboksylowych;

Fig.3 przedstawia intensywność wzrostu (A 750 nm) szczepów bakterii będących składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego, na substratach należących do aminokwasów, alkoholi cukrowych, węglowodanów, kwasów cukrowych, pochodnych cukrowych oraz kwasów karboksylowych;

Fig.4 przedstawia wrażliwość chemiczną szczepów bakterii będących składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego, na podstawie zahamowania procesów oddechowych (A 590 nm), wobec wybranych związków, w tym antybiotyków i barwników;

Fig.5 przedstawia wrażliwość chemiczną wobec wybranych związków, którą wykazują szczepy bakterii będące składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego, na podstawie zahamowania intensywności wzrostu (A 750 nm);

Fig.6 przedstawia profile aktywności enzymatycznej szczepów bakterii będących składnikami biopreparatu, określone na podstawie testów API ZYM (Biomérieux);

Fig.7 przedstawia tabelę prezentującą właściwości metaboliczne szczepów bakteryjnych wchodzących w skład nawozowego produktu mikrobiologicznego;

Fig.8 przedstawia antagonizm bakteryjnego biopreparatu, w postaci peletu, zawierającego szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*;

Fig.9 przedstawia tabelę prezentującą właściwości antagonistyczne nawozowego produktu mikrobiologicznego, w postaci peletu, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC, wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*;

Fig.10 przedstawia antagonizm nawozowego produktu mikrobiologicznego w postaci peletu, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora* po 6 miesiącach przechowywania biopreparatu w temperaturze pokojowej (około 21°C), 4°C oraz 35°C;

Fig.11 przedstawia względny skład procentowy grup troficznych grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego

zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC;

Fig.12 przedstawia występowanie gildii funkcjonalnych w grupach obejmujących patotrofy grzybowe występujące w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC;

Fig.13 przedstawia względną obfitość typów bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC;

Fig.14 przedstawia względną obfitość klas bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC;

Fig.15 przedstawia względną obfitość – bioróżnorodność rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC, przy czym im więcej kolorowych prążków tym większa jest bioróżnorodność bakterii;

Fig.16 przedstawia względną obfitość typów grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC;

Fig.17 przedstawia względną obfitość klas grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC;

Fig.18 przedstawia względną obfitość – bioróżnorodność rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. AF75BC, przy czym im więcej kolorowych prążków tym większa jest bioróżnorodność grzybów;

Fig.19 przedstawia wygląd nawozowego preparatu mikrobiologicznego w postaci suchej do aplikacji posypowej oraz w postaci peletu;

Fig.20 przedstawia rozkład biopreparatu w formie peletu w glebie w ciągu 5 dni od zastosowania.

PRZYKŁADY

Przykład 1. Identyfikacja oraz charakterystyka biochemiczna szczepów bakterii będących składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego

Dwa szczepy bakterii wyselekcjonowane do przygotowania produktu w formie peletu zidentyfikowano do gatunku lub rodzaju z wykorzystaniem amplifikacji genu 16S rDNA oraz sekwencjonowania metodą Sanger. Uzyskane w wyniku sekwencjonowania sekwencje nukleotydów zostały przeanalizowane porównawczo z sekwencjami nukleotydowymi w bazach danych (w komercyjnej bazie MicroSeq^{ID} oraz w **otwartej** bazie NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Wchodzące w skład produktu szczepy bakterii AF75AB2 – sekwencja nr 1 i AF75BC – sekwencja nr 2, na podstawie analizy molekularnej i bioinformatycznej zidentyfikowano do gatunku *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz do rodzaju *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, uzyskane sekwencje nukleotydowe przedstawiono na Liście Sekwencji.

Wykazano, że szczepy charakteryzowały się bardzo dobrym wzrostem o kremowym zabarwieniu na podłożu agarowym PCA – Plate Count Agar (Fig.1). Wybrane do opracowania nawozowego produktu mikrobiologicznego szczepy bakteryjne AF75AB2 oraz AF75BC scharakteryzowano pod względem podstawowych właściwości metabolicznych, które mają wpływ na kształtowanie właściwości środowiska glebowego. Aktywność biochemiczna szczepów wchodzących w skład produktu została scharakteryzowana na podstawie zdolności do utylizacji 71 substratów węglowych należących do związków: aminokwasów, alkoholi cukrowych, węglowodanów, kwasów cukrowych, pochodnych cukrowych oraz kwasów karboksylowych (Fig.2), jak również określenia stopnia wzrostu w obecności tych substratów (Fig.3). Określono wrażliwość chemiczną szczepów AF75AB2 oraz AF75BC wobec 23 związków chemicznych należących m.in. do antybiotyków i barwników. Wrażliwość szczepów bakteryjnych na te związki oceniono na podstawie zahamowania ich procesów respiracyjnych i przedstawiono w postaci profilu intensywności oddechowej poszczególnych związków chemicznych (Fig.4), jak również poprzez ocenę zahamowania stopnia wzrostu bakterii w obecności badanych związków (Fig.5). Zdolności biochemiczne wybranych szczepów

bakteryjnych określono przy zastosowaniu testów API ZYM (Biomerieux) umożliwiających określenie aktywności enzymów hydrolitycznych uczestniczących w przemianach materii organicznej, m.in. fosfataz, esteraz, aryamidaz, fosfohydrolazy, β -glukozydazy, β -galaktozydazy, mannozydazy, glukozaaminidazy (Fig.6). Zdolności enzymatyczne oznaczono w hodowlach szczepów bakteryjnych o gęstości 5-6 w skali McFerland'a. Szczep *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 na liście sekwencji wykazywał wysoką aktywność fosfatazy alkalicznej, esterazy, esterazy lipazy, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI, α - i β -glukozydazy. Szczep *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja 2 na liście sekwencji, charakteryzował się wysoką aktywnością esterazy oraz średnią lub niską aktywnością esterazy lipazy, lipazy, kwaśnej fosfatazy, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI, α - galaktozydazy, β – glukozydazy, N-acetylo- β - glukozaaminidazy (Fig.7).

Przykład 2. Określenie zdolności antagonistycznych nawozowego produktu mikrobiologicznego w postaci peletu, zawierającego szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC wobec roślinnych patogenów z rodzaju *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Phytophthora* oraz *Verticillium* – eksperyment szalkowy

Zdolności antagonistyczne produktu określano poprzez pomiar strefy zahamowania wzrostu grzybni. Płytki Petriego o średnicy 90 mm z podłożem agarowym PCA (Plate Count Agar) zaszczipiano 300 μ l zawiesiny zarodników grzyba fitopatogenicznego *Colletotrichum* sp. (G171/18), *Botrytis* sp. (G277/18) oraz *Verticillium* sp. (G297/18), a także grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora* sp. (G408/18) o transmitancji 70%. Płytki inkubowano w temperaturze 23°C przez 24 godziny. Następnie po wstępnej inkubacji fitopatogenów na płytce na środek płytki wykładano produkt w formie suchego peletu (zwilżony wodą sterylną). Płytki inkubowano w temperaturze 23°C, przez 5-7 dni i dokonywano pomiaru stref zahamowania wzrostu grzybni lub/i zahamowania zarodnikowania, potwierdzając antagonistyczne działanie opracowanego nawozowego produktu mikrobiologicznego w postaci peletu wobec kluczowych fitopatogenów owoców miękkich (Fig.8-Fig.9).

Przeprowadzono także badania przechowalnicze, w ramach, których okresowo w czasie 6 miesięcy przechowywania produktu w różnych warunkach, w tym w temperaturze pokojowej (~21°C), warunkach chłodniczych (4°C) oraz w podwyższonej temperaturze składowania (35°C), określano właściwości antagonistyczne produktu. Uzyskane wyniki wskazują, że właściwości antagonistyczne nawozowego produktu mikrobiologicznego wobec kluczowych

fitopatogenów grzybowych i grzybopodobnych lęgniowców owoców miękkich na ogół utrzymywały się w czasie przechowywania, jednakże efekt ten zależny był zarówno od testowanego patogenu oraz zastosowanych warunków przechowywania (Fig.10). Najlepsze właściwości antagonistyczne po 6 miesiącach przechowywania nawozowego produktu mikrobiologicznego w postaci peletu, zawierającego bakterie uzyskano dla produktu przechowywanego w temperaturze pokojowej oraz w warunkach chłodniczych wobec grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora* sp., a także grzybów *Botrytis* sp. i *Verticillium* sp., wykazując właściwości biobójcze i niedopuszczając do rozwoju albo ograniczając wzrost tych patogenów, a dla fitopatogenu grzybowego *Colletotrichum* sp. zaobserwowano działanie fungistatyczne produktu, objawiające się hamowaniem zarodnikowania tego grzyba (Fig.10). Obserwowane efekty były słabsze dla produktu przechowywanego w podwyższonej temperaturze składowania 35°C (Fig.10).

Przykład 3. Określenie liczebności bakterii w nawozowym produkcie mikrobiologicznym

Liczebność mikroorganizmów w przygotowanym preparacie określono poprzez zliczenie i określenie ogólnej liczebności bakterii metodą wysiewu rozcieńczeń. Przygotowano szereg rozcieńczeń nawozowego produktu mikrobiologicznego od 10^{-1} do 10^{-8} , z każdego rozcieńczenia wysiano po 0,1 ml na płytkę Petriego o średnicy 90 mm z podłożem PCA, rozprowadzono równomiernie po powierzchni podłoża po czym inkubowano w temperaturze 26°C, przez 72 godziny. Wyrosłe kolonie zliczono i wyznaczono ogólną liczebność bakterii (jtk/g) w bioprodukcie.

W preparacie po wytworzeniu wykazano ogólną liczebność bakterii na poziomie $>10^9$ jtk/g produktu bakteryjnego w postaci w postaci sypkiej oraz w postaci peletu. Wyniki badań przechowalniczych wykazały na utrzymywanie się w preparacie bakteryjnym liczebności na poziomie $>10^8$ jtk/g, a nawet $>10^9$ jtk/g (pelet przechowywany w podwyższonej temperaturze składowania 35°C) produktu w zależności od zastosowanych warunków przechowywania przez okres 6 miesięcy.

Przykład 4. Działanie nawozowego produktu mikrobiologicznego na utrzymanie i/lub poprawę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby i mikrobiom roślin – testy wazonowe

W celu określenia działania nawozowego produktu mikrobiologicznego na bioróżnorodność mikrobiologiczną gleby i mikrobiom roślin przeprowadzono eksperyment

szklarniowy na roślinach maliny odmiany Polana. Rośliny posadzono do doniczek o pojemności 3 litrów zawierających podłoże wzrostowe składające się z ½ objętości gleby i ½ objętości torfu o granulacji 7-20 mm. Produkt zaaplikowano do gleby, a kombinację kontrolną stanowiły rośliny nietraktowane produktem, rosnące w podłożu z dodatkiem 5 g suszonego obornika na doniczkę. W celu określenia zmian bioróżnorodności wykonano badania obejmujące charakterystykę zbiorowisk bakterii i grzybów za pomocą sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania w technologii Illumina SBS (Sequencing-by-Synthesis) za pomocą aparatu MiSeq oraz narzędzi bioinformatycznych takich jak QIIME2 i dokonano analizy uzyskanych wyników w oparciu o sekwencjonowanie markera 16S rDNA dla bakterii oraz ITS1 dla grzybów i określono różnorodność mikroorganizmów ryzosfery i korzeni roślin. Aplikacja produktu bakteryjnego pozwoliła ocenić zmiany bioróżnorodności, w tym występowanie wariantów sekwencji amplikonu (ASV) na różnych poziomach taksonomicznych bakterii i grzybów w ryzosferze oraz korzeniach roślin traktowanych i nietraktowanych produktem. Dokonano również analizy grup troficznych i gildii funkcjonalnych grzybów z wykorzystaniem bazy danych FunGuild (Fig.11-Fig.12). Wyniki te wykazały, że w korzeniu roślin traktowanych nawozowym produktem mikrobiologicznym zaobserwowano obniżenie patotrofów, a także odnotowano zwiększenie saprotrofów w korzeniu. Wykazano również bardzo duże obniżenie patotrofów, oraz trybów mieszanych: patotrof-saprotrof-symbiotrof oraz patotrof-symbiotrof, a także duże zwiększenie symbiotrofów i trybu mieszanego grzybów sapro-symbiotrofów w ryzosferze malin traktowanych nawozowym produktem mikrobiologicznym (Fig.11), co potwierdza zasadność wykorzystania produktu w celu kondycjonowania gleby. Dodatkowo wykazano, że w po aplikacji produktu bardzo znacznie zmniejszyła się ilość gildii przypisanych do wszystkich testowanych grup patotrofów, a w szczególności zaobserwowano obniżenie patogenów roślin zarówno w ryzosferze roślin, jak też w korzeniu (Fig.12). Analiza wyników uzyskanych dla zbiorowisk bakterii wykazała na ogół zwiększenie względnej obfitości i bioróżnorodności bakterii na różnych poziomach taksonomicznych po zastosowaniu produktu. Efekt ten odnotowano zarówno w glebie ryzosferowej, jak również korzeniu (Fig.13-Fig.15). Analiza wyników zbiorowisk grzybów potwierdziła brak zwiększenia bioróżnorodności tej grupy mikroorganizmów w korzeniu roślin malin traktowanych produktem, a w ryzosferze utrzymanie podobnego poziomu lub obniżenie obfitości grzybów w porównaniu do kontroli nietraktowanej produktem (Fig.16-Fig.18), ale przy zestawieniu z wynikami grup troficznych grzybów (Fig.11-Fig.12) jest to korzystna obserwacja, co może wskazywać na ochronne

działanie nawozowego produktu mikrobiologicznego, ograniczając wnikanie do korzeni, zwłaszcza niekorzystnych dla roślin grzybów.

Zaletą nawozowego produktu mikrobiologicznego jest jego duża uniwersalność, potwierdzona tym, że jest on dedykowany do kondycjonowania gleby oraz utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby i mikrobiomu roślin owoców miękkich, przy jednoczesnej kontroli fitopatogenów występujących w tych uprawach. Opracowany nawozowy produkt mikrobiologiczny jest skuteczny wobec wielu patogenów występujących na plantacjach owoców miękkich, a jego dodatkową zaletą jest to, że jest on oparty o naturalne składniki z uwzględnieniem rodzimych szczepów bakteryjnych, wyodrębnionych z ryzosfery zdrowych roślin, a tym samym przyjazny dla środowiska. Dodatkową bardzo istotną zaletą produktu bakteryjnego jest mnogość sposobów jego aplikacji dzięki postaci suchej do aplikacji posypowej, peletu do wymieszania z glebą lub aplikacji pod sadzonki roślin, a także postaci sypkich do zawieszenia lub rozpuszczenia w wodzie umożliwiających oprysk, zraszanie czy podlewanie, co stanowi kompleksową technologię aplikacji w zależności od potrzeb oraz w całym sezonie wegetacji roślin od zakładania plantacji, do zbioru owoców.

Przykład 5. Działanie nawozowego produktu mikrobiologicznego na wzrost i rozwój roślin truskawki i maliny, występowanie fitopatogenów w uprawie ekologicznej roślin truskawki oraz bioróżnorodność mikrobiologiczną w uprawie roślin maliny – testy polowe

W celu określenia wpływu nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC na plonowanie roślin oraz występowanie fitopatogenów przeprowadzono doświadczenia polowe, w których do technologii uprawy został wprowadzony nawozowy produkt mikrobiologiczny, jako jeden z komponentów całej technologii uprawy stosowanej w uprawie ekologicznej truskawki i maliny. Testy prowadzono na trzech odmianach truskawki Honeoye, Rumba i Vibrant w przypadku aplikacji peletu bezpośrednio pod sadzonki roślin. Dodatkowo testy opracowanego nawozowego produktu mikrobiologicznego w formie suchej do aplikacji posypowej oraz peletu, wprowadzonego jako jeden z elementów technologii produkcji malin ekologicznych, prowadzono w oparciu o doświadczenie z czterema odmianami malin: Delniwa, Enrosadira, Rosalita i Poemat. Uzyskane wyniki wskazują, że gatunki i odmiany roślin różnie reagowały na testowane technologie uprawy, w tym dodatek nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii. W obiekcie nienawadnianym, w wariantach, w których wprowadzono dodatek opracowanego nawozowego

produktu mikrobiologicznego, zastosowanego w pierwszym roku w formie peletu, zaobserwowano zwiększenie plonu truskawki odmiany Honeoye. Zaobserwowano, że u odmiany Rumba w obiekcie nienawadnianym, w wariacie, w którym zastosowano dodatek produktu bakteryjnego, zmniejszyło się porażenie skórzastą zgnilizną owoców. Odmiany Rumba i Vibrant zareagowały natomiast zmniejszeniem porażenia szarą pleśnią. Ponadto, po aplikacji produktu zaobserwowano zwiększenie świeżej masy korzeni roślin truskawki. Wyniki wskazują, że dla niektórych odmian maliny, zwłaszcza Enrosadira i Rosalita, zaobserwowano zwiększenie różnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów glebowych, a także zasiedlających roślinę i owoce. Efekt ten dotyczył przede wszystkim zwiększenia wskaźników bioróżnorodności, w tym AWCD (Average Well Colour Development), który jest miarą ogólnej aktywności mikrobiologicznej oraz R (Richness), który informuje o liczbie uruchamianych substratów węglowych przez zbiorowiska mikroorganizmów. Przeprowadzone badania wskazują, że aktywność metaboliczna mikroorganizmów występujących w roślinie i owocu zwiększyła się w szczególności w stosunku do węglowodanów, w wariacie w którym jako jeden z elementów uprawy zastosowany był opracowany produkt bakteryjny w formie żelu.

Przykład 6. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formułacja sypka

Do otrzymania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania gleby oraz utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, wpływającego na wzrost i rozwój roślin, pozwalającego jednocześnie na kontrolę fitopatogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich, zastosowano 2 wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, niewykluczające swojego działania następujące szczepy bakterii: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, na liście sekwencji, dla których prowadzono osobne hodowle, które mieszano w równych proporcjach, w celu uzyskania kompozycji zawierającej wyizolowane z ryzosfery szczepy saprofitycznych bakterii, a hodowle namnażające prowadzono w temperaturze w 30°C.

Po wstępnym namnożeniu bakterii na agarowym podłożu Plate Count Agar w ciągu 24-48 godzin w temperaturze 25-26°C, uzyskanym inokulum zaszczepiano podłoże namnażające i prowadzono hodowlę wytrząsaną (120 rpm) przez 48 godzin w temperaturze 30°C. Pożywką namnażającą do wytworzenia produktu było zoptymalizowane podłoże zawierające: 6,6 g/L

Na_2HPO_4 , 3g/L KH_2PO_4 , 1g/L NH_4Cl , 0,5g/L NaCl , serwatkę kwaśną neutralizowaną w ilości 20 g/L, CaCl_2 w ilości 0,022 g/L, MgSO_4 w ilości 0,18g/L, FeCl_2 w ilości 12,9 mg oraz 10 ml roztworu mikroelementów zawierającego: 0,5mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM ZnCl_2 , 0,27 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,23 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,23 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Po otrzymaniu miana hodowli namnażającej przeprowadzono etap indukcji przetrwalnikowania poprzez zmianę warunków hodowli, obejmującą zmianę zasolenia podłoża hodowlanego, poprzez dodatek KCl , tak by zasolenie wynosiło 4%. Po 48 godzinach hodowli hodowle pasteryzowano poprzez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut. Tak przygotowana zawiesina przetrwalników była suszona rozpyłowo na kwaśnej neutralizowanej serwatce w proszku, stanowiąc podstawowy komponent produktu. W celu uzyskania 1 kilograma sypkiej postaci nawozowego produktu mikrobiologicznego do aplikacji posypowej do 830 g serwatki w proszku, zawierającej $>10^9$ jtk/g przetrwalników bakterii, w tym 415 g serwatki z przetrwalnikami szczepu *Bacillus subtilis* AF75AB2 oraz 415 g serwatki z przetrwalnikami szczepu bakteryjnego *Bacillus* sp. AF75BC dodawano po 100 g otrąb pszennych z pszenicy durum, 50 g ekologicznego oleju rzepakowego, 10 g suchych kwasów humusowych, 10 g mielonych nasion gorczycy i 0,1 ml olejku z goździka. Po połączeniu i dokładnym wymieszaniu składników uzyskano nawozowy produkt mikrobiologiczny o formulacji sypkiej do aplikacji posypowej, charakteryzujący się liczebnością bakterii 10^9 jtk/g produktu.

Przykład 7. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – postać peletu

Sposób prowadzono jak w Przykładzie 6., z **tym**, że po połączeniu i wymieszaniu wszystkich składników, dla uzyskania postaci peletu, poddano je procesowi peletyzacji z wykorzystaniem pelleciarki Nawrocki Pelleting Technology, GRV340. Podczas procesu kontrolowano szybkość pelletowania oraz temperaturę i wilgotność peletowanego materiału, tak by temperatura wynosiła 26,6°C, a wilgotność mieściła się w granicach 4,35%-4,52%. Peletowanie prowadzono w dwóch pasażach, przy czym w pasażu I temperatura wyjściowa materiału wynosiła 65°C, a w pasażu II drugim 72,2°C. Po zakończeniu procesu peletowania **uzyskano** nawozowy produkt mikrobiologiczny, o wielkości peletu do 1 cm, charakteryzujący się liczebnością bakterii 10^9 jtk/g produktu. Produkt w formie mieszanki przed peletyzacją, gotowego peletu oraz jego rozkładu w wodzie i glebie **przedstawiono** na figurach (Fig.19- Fig.20).

Przykład 8. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formuacja sucha nierozpuszczalna w wodzie

Sposób prowadzono jak w Przykładzie 6., z **tym**, że po zakończeniu hodowli przygotowaną zawiesinę przetrwalników liofilizowano z dodatkiem serwatki w proszku, jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów. Dla uzyskania nierozpuszczalnej w wodzie formuacji suchej do oprysku bądź podlewania zastosowano po 10 g liofilizatu każdego ze szczepów bakteryjnych (*Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC) o zawartości bakterii 10^{11} jtk/g liofilizatu. Zamiast serwatki w proszku, otrąb pszennych i oleju rzepakowego, zastosowano 960 g nośnika w formie dolomitu mikronizowanego, do którego wprowadzono pozostałe składniki występujące w formie sypkiej produktu, w tym 10 g suchych kwasów humusowych, 10 g mielonych nasion gorczycy i 0,1 ml olejku z goździka.

Przykład 9. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formuacja sucha rozpuszczalna w wodzie

Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego prowadzono jak w Przykładzie 8. z tym, że do procesu liofilizacji zamiast dodatku serwatki w proszku dodano maltodekstrynę i zamiast nośnika w postaci dolomitu mikronizowanego zastosowano maltodekstrynę.

ZASTRZEŻENIA PATENTOWE

1. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania gleby i poprawy jej właściwości biologicznych (przy jednoczesnym kontrolowaniu patogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich wykazujący cechy biostymulacji roślin, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, **znamienny tym**, że stosuje się:

- dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na przygotowanym na wodzie podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, suszone na sypkim nośniku albo liofilizowane na sypkim nośniku;

- nośnik właściwy w postaci mieszaniny serwatki w proszku, otrąb pszennych i oleju rzepakowego dla postaci sypkiej do aplikacji posypowej lub dla postaci peletu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie;

- dodatek mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

2. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 1, **znamienny tym**, że obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, o sekwencjach odpowiednio nr 1 i 2, wskazanych na liście sekwencji, polegający na ich hodowli na podłożu namnażającym przygotowanym na wodzie z serwatką i z mikroelementami, zawieszeniu lub suszeniu na nośniku oraz suplementacji dodatkami w postaci suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego, przy czym szczepy bakterii namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu agarowym Plate Count Agar, w temperaturze 25-30°C przez 24-48 godzin, a następnie tak przygotowanym inokulum szczepi się płynne podłoże namnażające, w ilości 5%-15% objętości podłoża hodowlanego i prowadzi się hodowlę namnażającą w warunkach hodowli wytrząsanej w temperaturze 30°C przy 120 rpm.

3. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się inokulum o transmitancji 90%.

4. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że hodowlę namnażającą prowadzi się przez 48 godzin.

5. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że podłoże namnażające zawiera w 1 litrze: 20 g serwatki, 6,6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,022 g CaCl₂, 0,18 g MgSO₄, 12,9 mg FeCl₂, w granicach ±10% każdego ze składników podłoża.

6. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że dla podłoża namnażającego stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.

7. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że podłoże namnażające z serwatką zawiera mikroelementy: Mn, Zn, Cu, Co i Mo.

8. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że po otrzymaniu miana hodowli namnażającej nie mniejszego niż 10⁹ jtk/ml przeprowadza się etap indukcji przetrwalnikowania korzystnie

poprzez zmianę zasolenia podłoża hodowlanego dodatkiem KCl, do uzyskania zasolenia 4% i po 48 godzinach hodowli i wytworzeniu przetrwalników przez komórki bakteryjne, hodowlę pasteryzuje się poprzez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut i otrzymaną zawiesinę przetrwalników stosuje się jako główny komponent nawozowego produktu mikrobiologicznego.

9. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego zastrz. 2-8, **znamienny tym**, że po zakończeniu hodowli, przygotowaną zawiesinę przetrwalników suszy się w suszarce rozpyłowej na serwatce w proszku albo poddaje się liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku, jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów.

10. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że wysuszone bakterie albo liofilizaty bakteryjne o koncentracji nie mniejszej niż 10^{11} jtk/g dodaje się w równych ilościach do uzyskania produktu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g.

11. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że dla uzyskania postaci sypkiej do stosowania posypowego jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę: otrąb pszennych, korzystnie durum, w ilości 80-120 g/kg produktu, oleju rzepakowego w ilości 40-60 g/kg produktu, suchych kwasów humusowych w ilości 8-12 g/kg produktu, olejku z goździka w ilości 0,1 ml/kg produktu, mielonych nasion gorzycy w ilości 8-12 g/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną, stanowiącą dopełnienie do 1 kg.

12. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 11, **znamienny tym**, że do postaci peletu do kondycjonowania gleby przygotowaną postać sypką do stosowania posypowego poddaje się peletyzacji, korzystnie przy temperaturze wejściowej peletowanego materiału wynoszącej 25°C-28°C oraz wilgotności peletowanego materiału mieszczącej się w granicach 4-5%.

13. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-10, **znamienny tym**, że dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie dolomit mikronizowany jako komponent nośnika stanowi dopełnienie do 1 kg produktu.

14. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-10, **znamienny tym**, że dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie maltodekstryna jako komponent nośnika stanowi dopełnienie do 1 kg produktu.

15. Nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania gleby i poprawy jej właściwości biologicznych, przy jednoczesnym kontrolowaniu patogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazujący cechy biostymulacji roślin, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, **znamienny tym**, że zawiera dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, suszone na sypkim nośniku albo liofilizowane na sypkim nośniku, nośnik właściwy w postaci mieszaniny serwatki w proszku, otrąb pszennych i oleju rzepakowego dla postaci sypkiej do aplikacji posypowej oraz dla postaci peletu produktu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie, dodatek mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

16. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 15, **znamienny tym**, że zawiera szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, na liście sekwencji, w równym stosunku wagowym.

17. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 15 albo 16, **znamienny tym**, że izolaty bakteryjne wyhodowane są na podłożu namnażającym z serwatką w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.

18. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 15-17, **znamienny tym**, że koncentracja każdego z wysuszonych albo liofilizowanych szczepów bakteryjnych jest w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g.

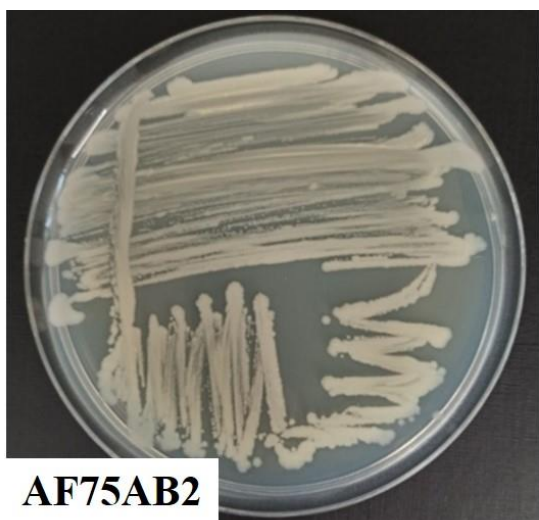
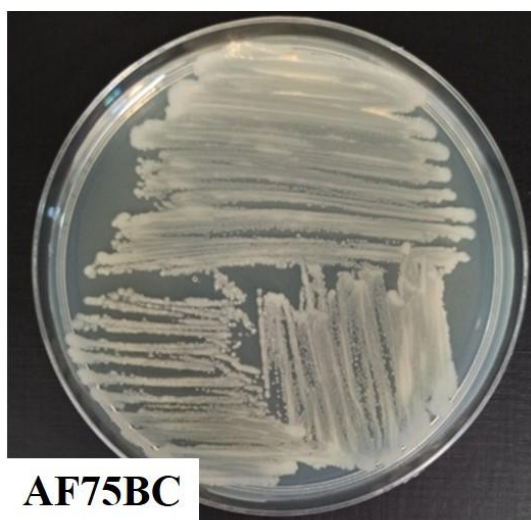
19. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 15-18, **znamienny tym**, że jego postać sypka do stosowania posypowego zawiera w 1 kilogramie 80-120 g otrąb pszennych korzystnie durum, 40-60 g oleju rzepakowego korzystnie **ekologicznego**, 8-12 g suchych kwasów humusowych, 8-12 g mielonych nasion gorczycy i 0,1 ml olejku z goździka, a jako nośnik wszystkich komponentów produktu zawiera serwatkę w proszku korzystnie kwaśną neutralizowaną, stanowiącą dopełnienie do 1 kg.

20. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 15-19, **znamienny tym**, że ma postać peletu.

21. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 15-18, **znamienny tym**, że jego postać sucha nierozpuszczalna w wodzie zawiera serwatkę sproszkowaną jako

krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego, a dolomit mikronizowany jako nośnik stanowi dopełnienie do 1 kg.

22. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 15-18, **znamienny tym**, że jego postać sucha rozpuszczalna w wodzie zawiera maltodekstrynę jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego, a maltodekstryna jako nośnik stanowi dopełnienie do 1 kg.

**AF75AB2****AF75BC****Fig. 1**

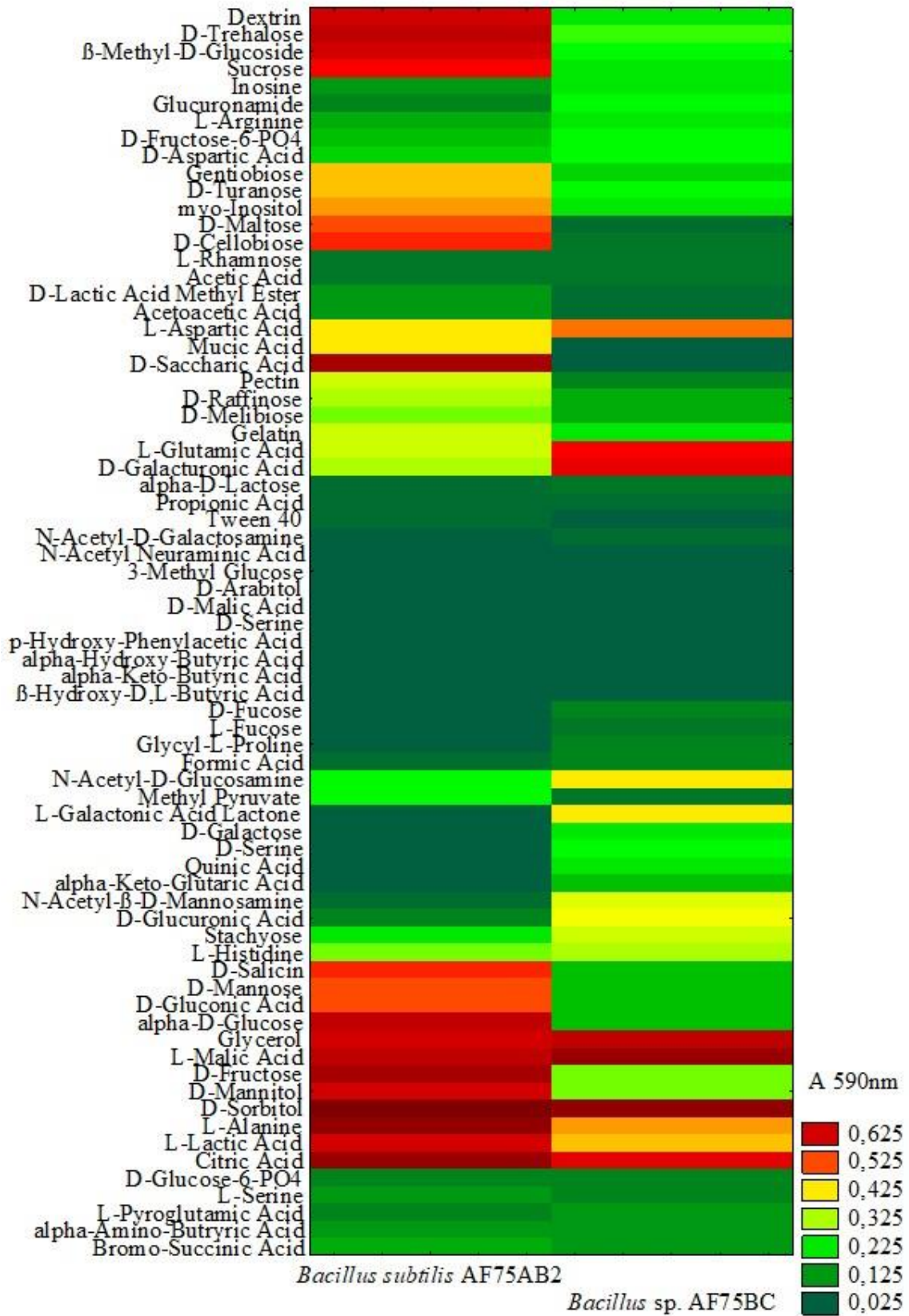


Fig. 2

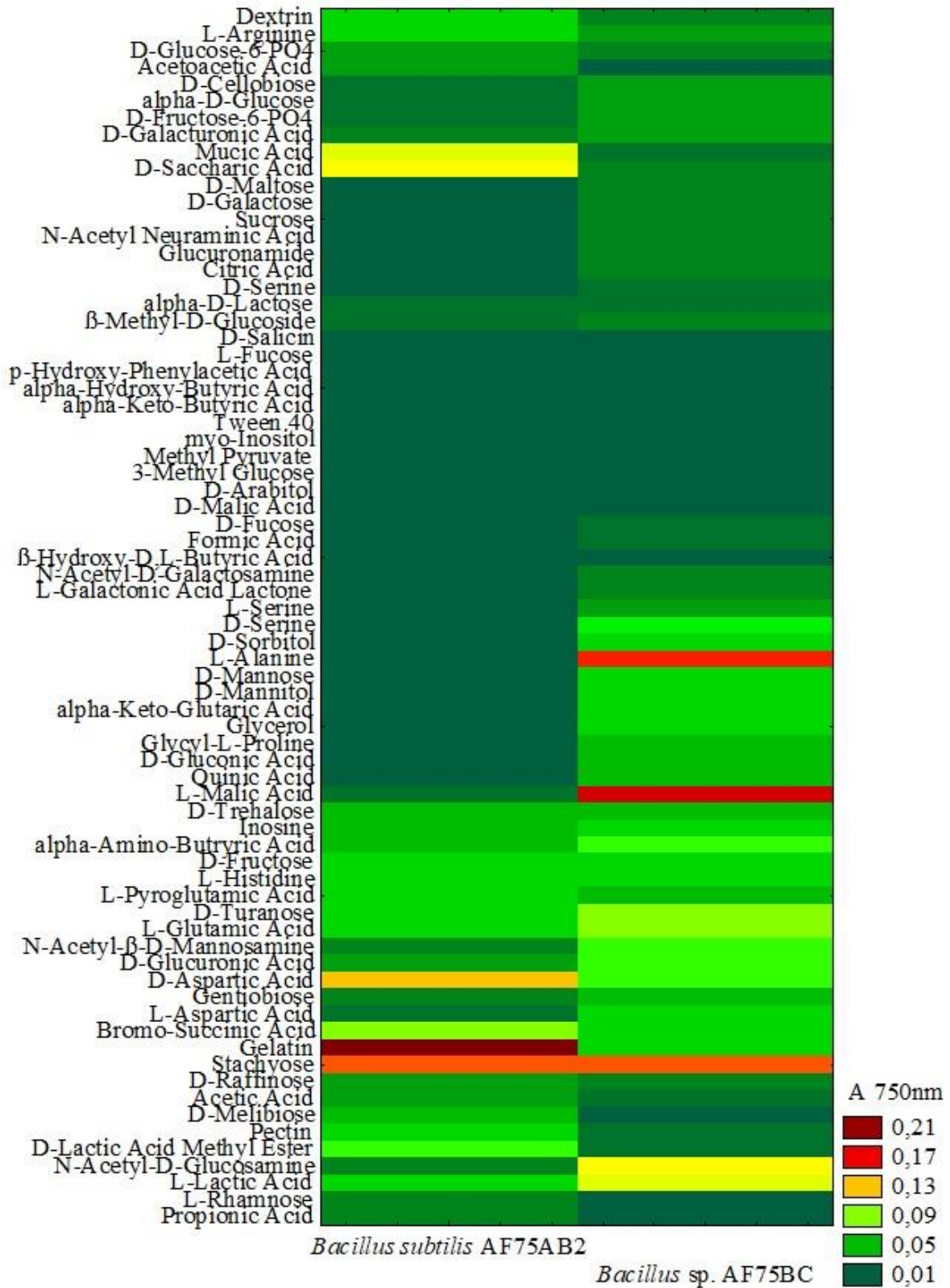


Fig. 3

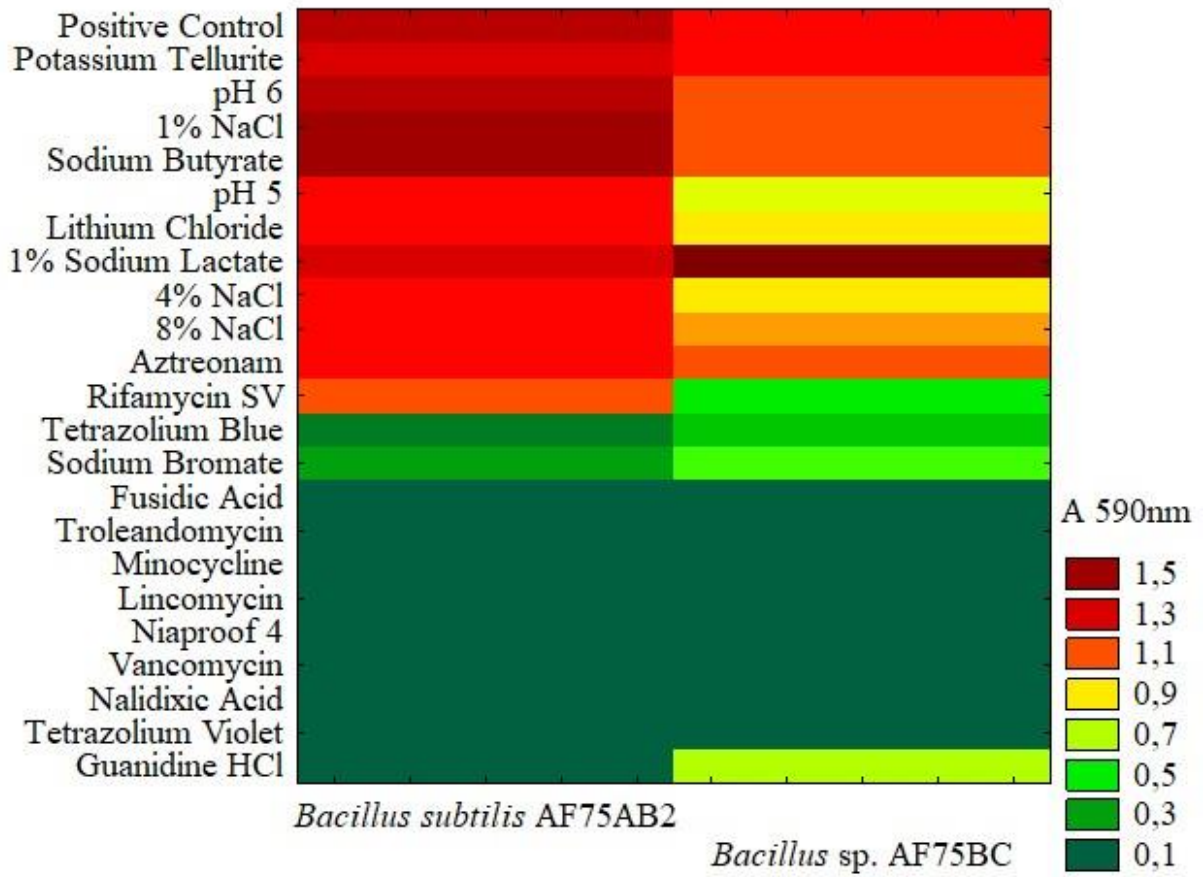


Fig. 4

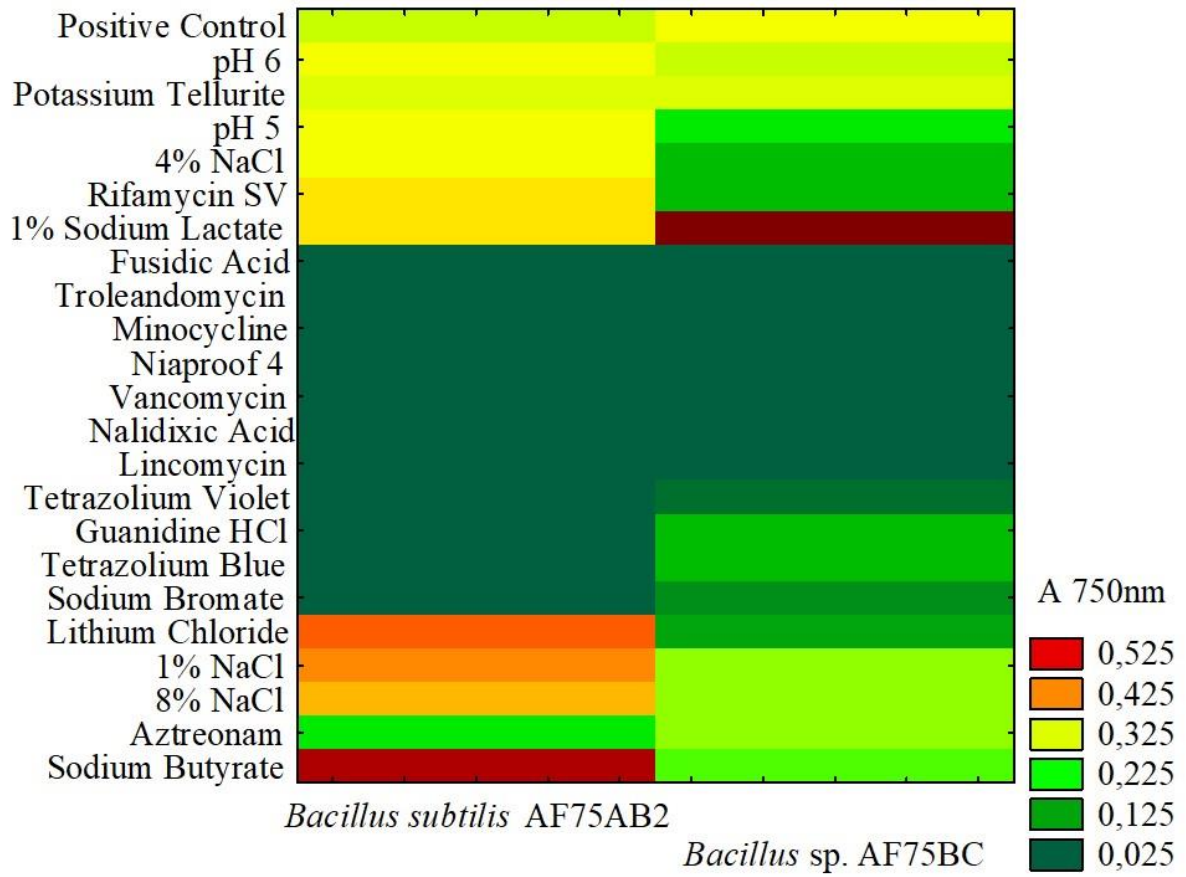


Fig. 5



Fig. 6

Aktywność enzymatyczna	Zastosowany substrat	AF75AB2	AF75BC
Fosfataza alkaliczna	2- naftylo- fosforan	-	-
Esteraza (C 4)	2-naftylo-maślan	+++	+++
Esteraza lipaza (C 8)	2-naftylo-kaprylan	+++	++
Lipaza (C 14)	2- naftylo- mirystynian	+++	++
Arylamidaza leucyny	L-leucylo-2- naftylamid	-	-
Arylamidaza waliny	L-walilo-2- naftylamid	++	-
Arylamidaza cystyny	L-cystylo-2-naftylamid	+	-
Trypsyna	N-benzoilo-DL-arginino-2- naftylamid	-	-
α - chymotrypsyna	N-glutarylo-feniloalanino-2-naftylamid	-	+
Kwaśna fosfataza	2-naftylo-fosforan	-	++
Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI	Naftylo-AS-BI-fosforan	++	++
α - galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-galaktopiranosyd	+++	++
β - galaktozydaza	2-naftylo- β D-galaktopiranosyd	++	-
β - glukuronidaza	Naftylo-AS-BI- β D- glukuronid	-	-
α - glukozydaza	2- naftylo- α D- glukopiranozyd	-	-
β - glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β D-galaktopiranozyd	+++	+
N-acetylo- β -glukozaminidaza	1- naftylo-N- acetyl- β D-glukozaminid	+++	++
α - mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-mannopiranozyd	-	-
α - fukozydaza	2- naftylo- α L- fukopiranozyd	-	-

Fig. 7

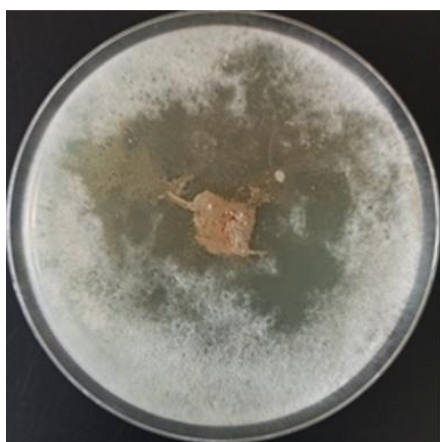
Colletotrichum sp.*Botrytis* sp.*Phytophthora* sp.*Verticillium* sp.

Fig. 8

Patogen grzybowy	Strefa zahamowania wzrostu (mm) ±odchylenie standardowe
<i>Colletotrichum</i> sp. G171/18	68,50 ±2,10
<i>Botrytis</i> sp. G277/18	67,50 ±31,80
<i>Phytophthora</i> sp. G408/18	40,00 ±2,80
<i>Verticillium</i> sp. G297/18	20,00 ±1,40

Fig.9

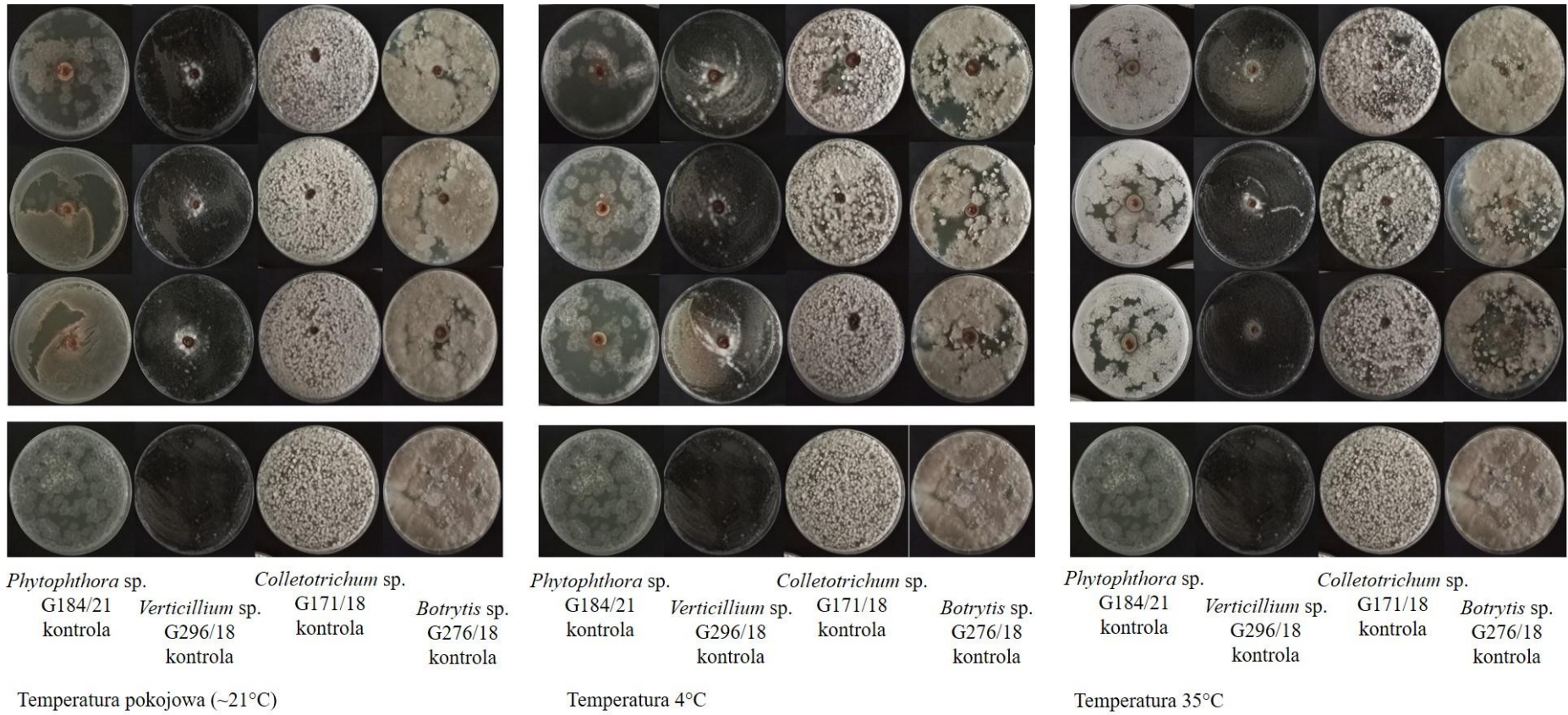


Fig. 10

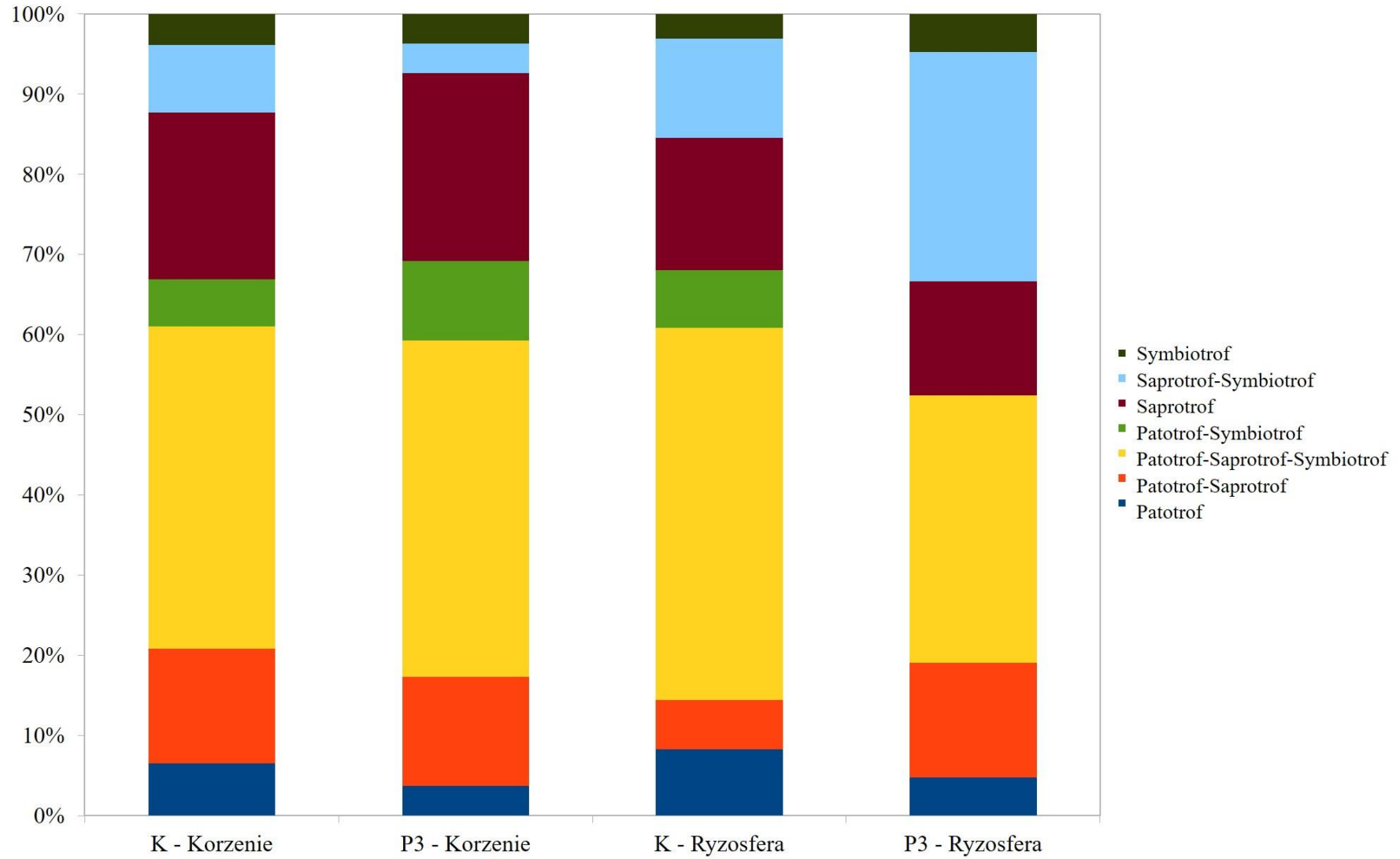


Fig.11

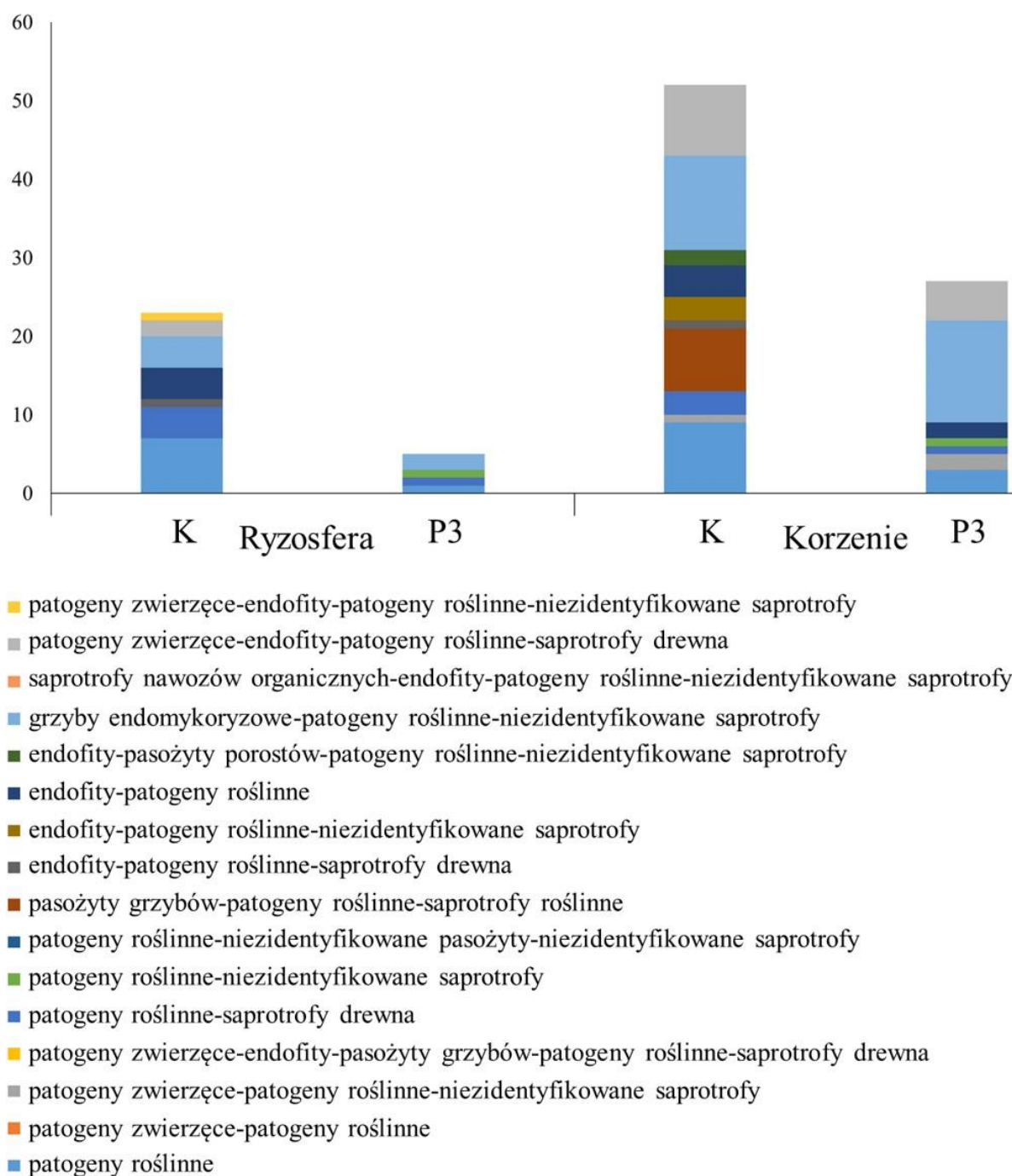


Fig.12

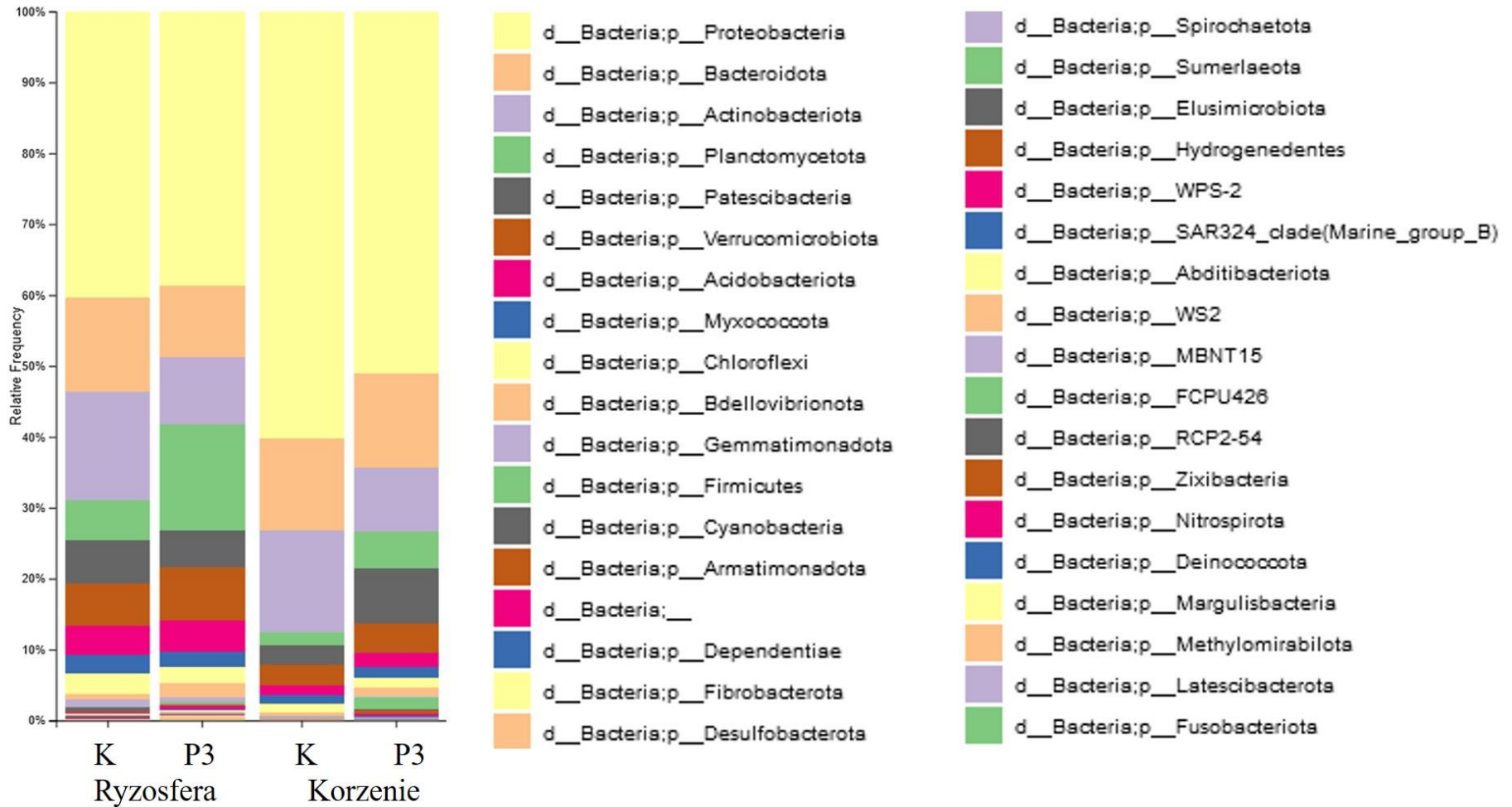


Fig. 13

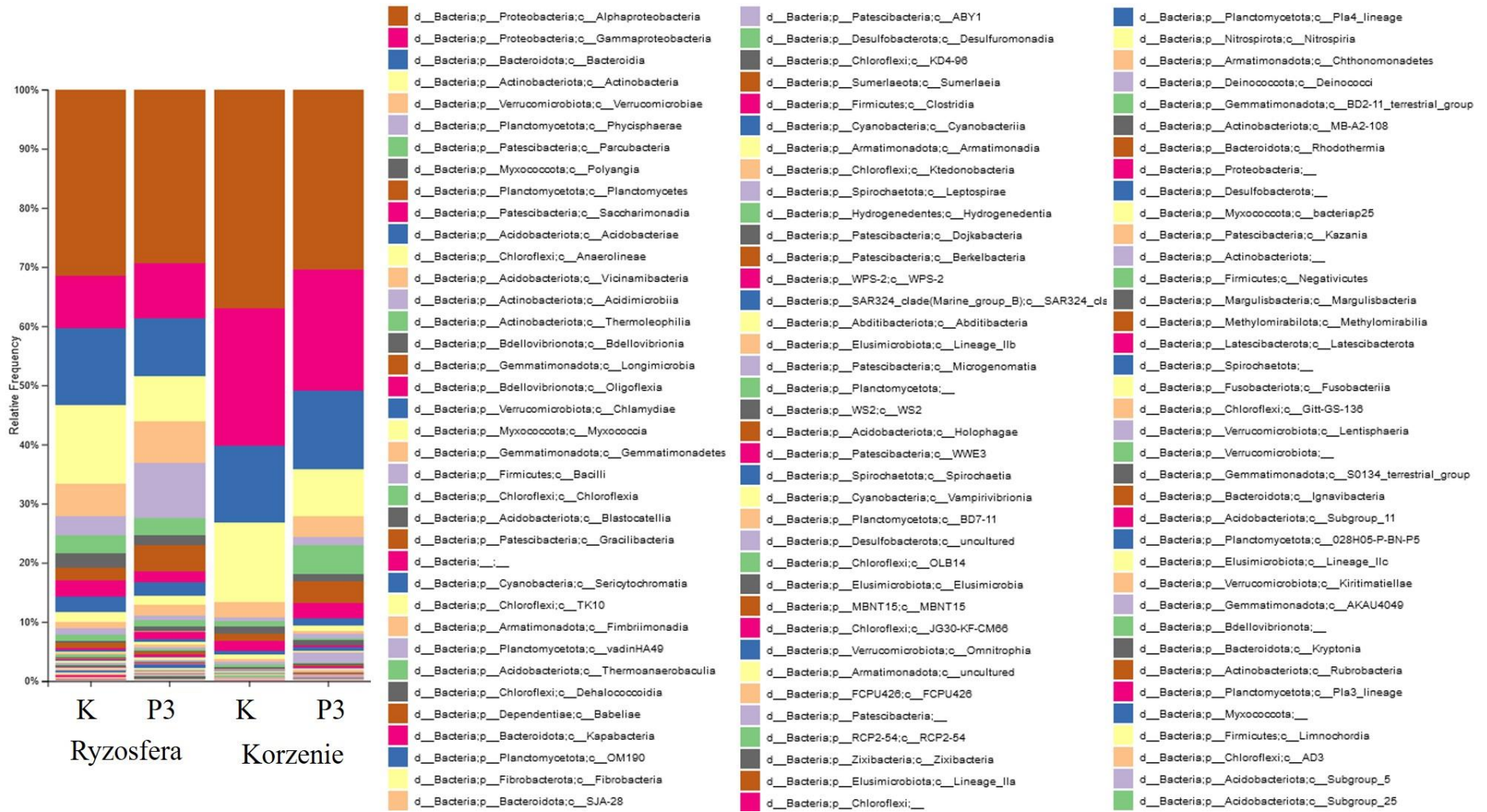


Fig. 14

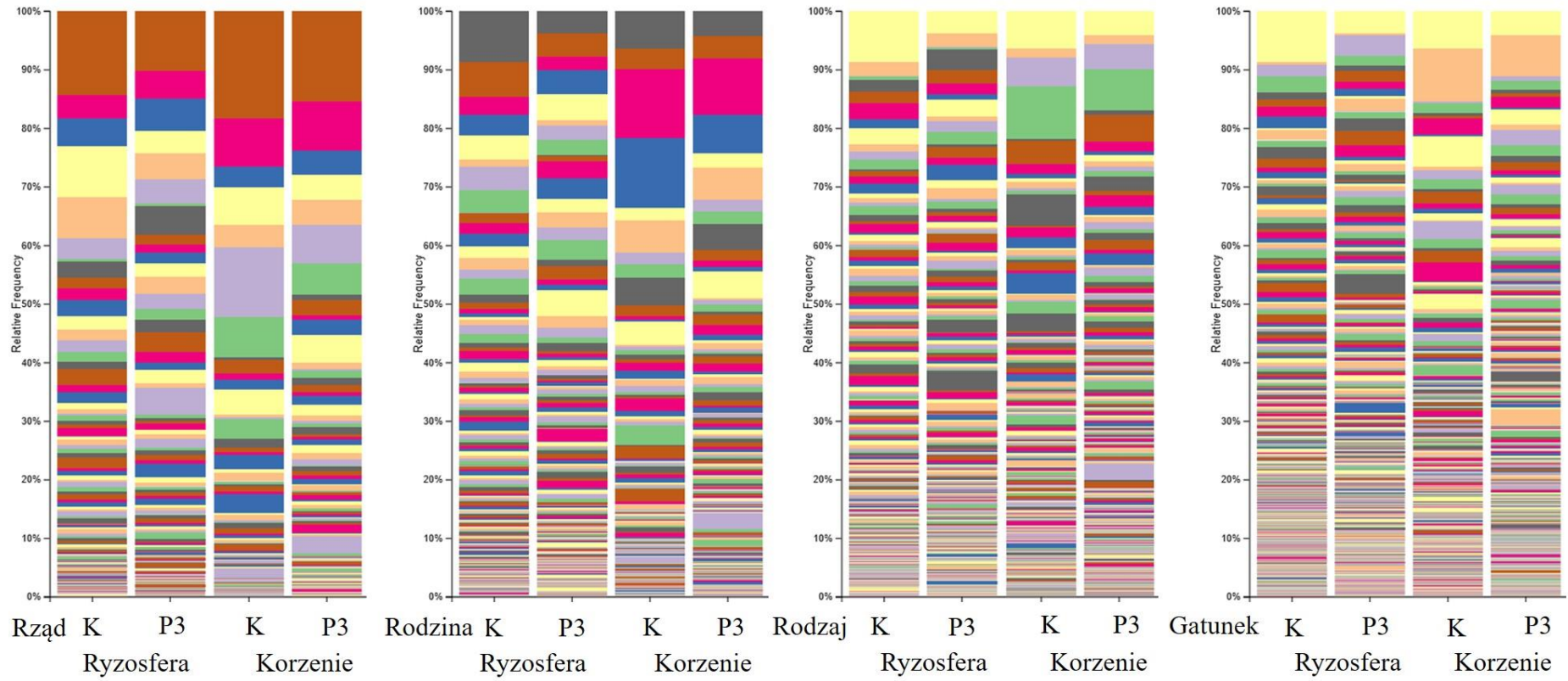


Fig.15

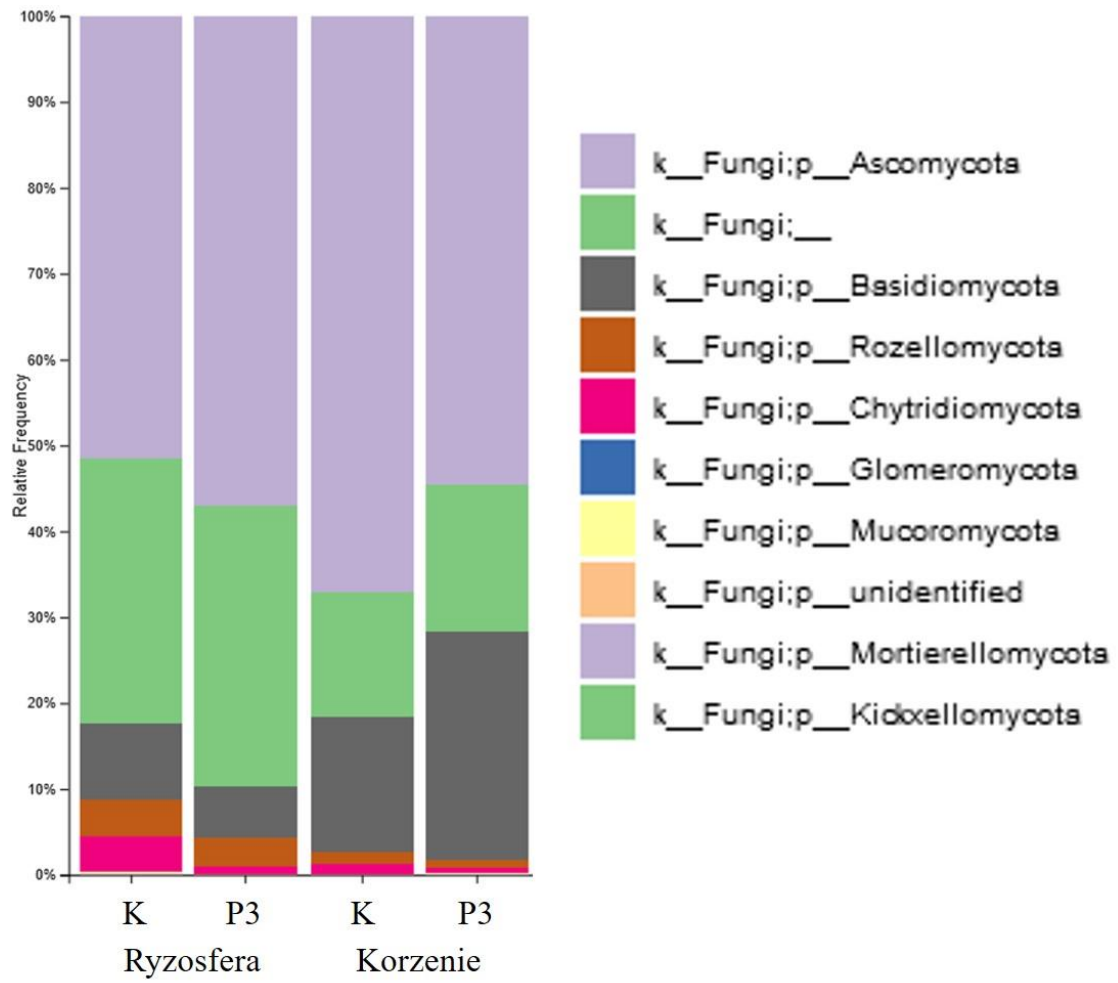


Fig.16

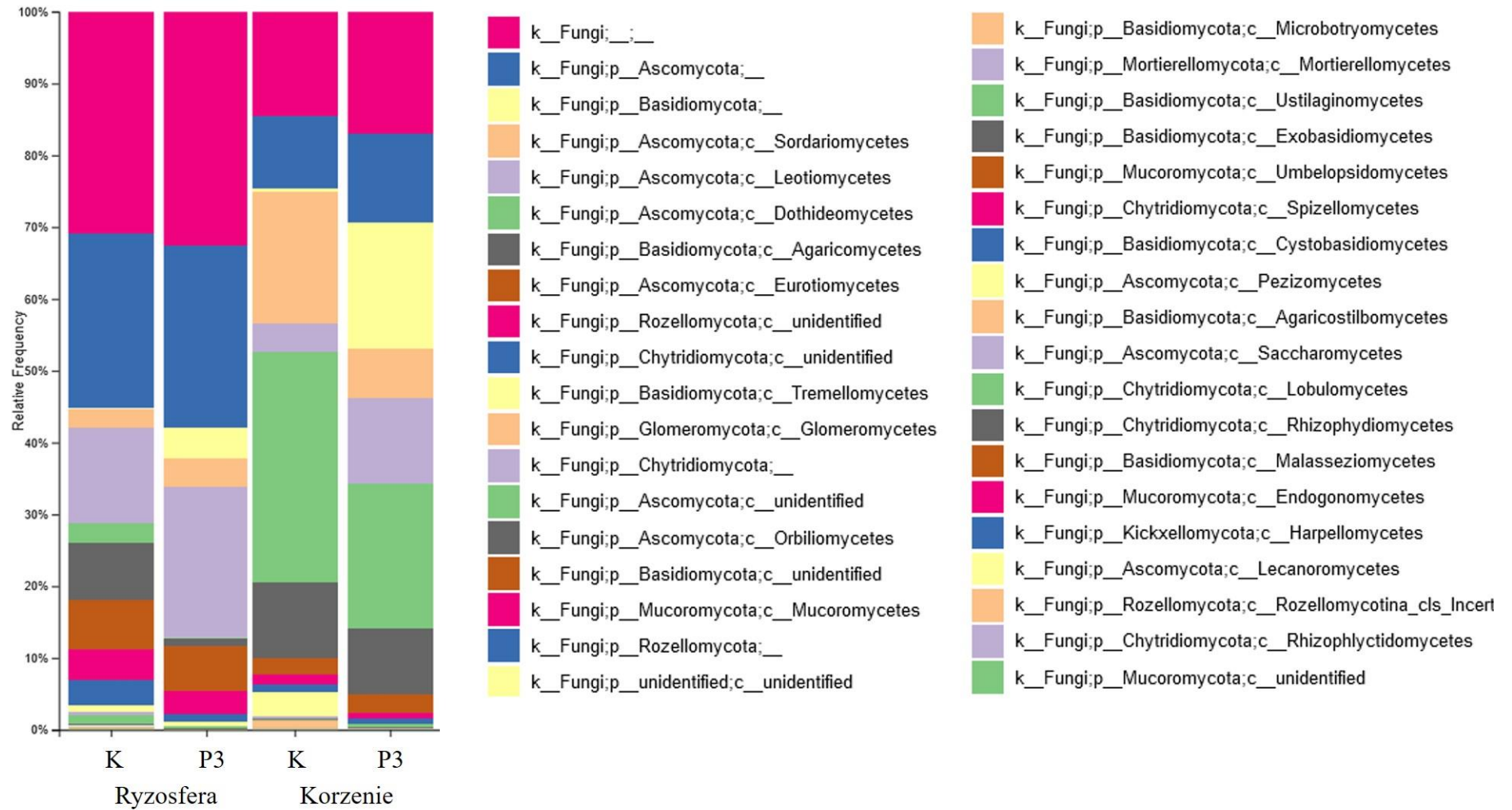


Fig. 17

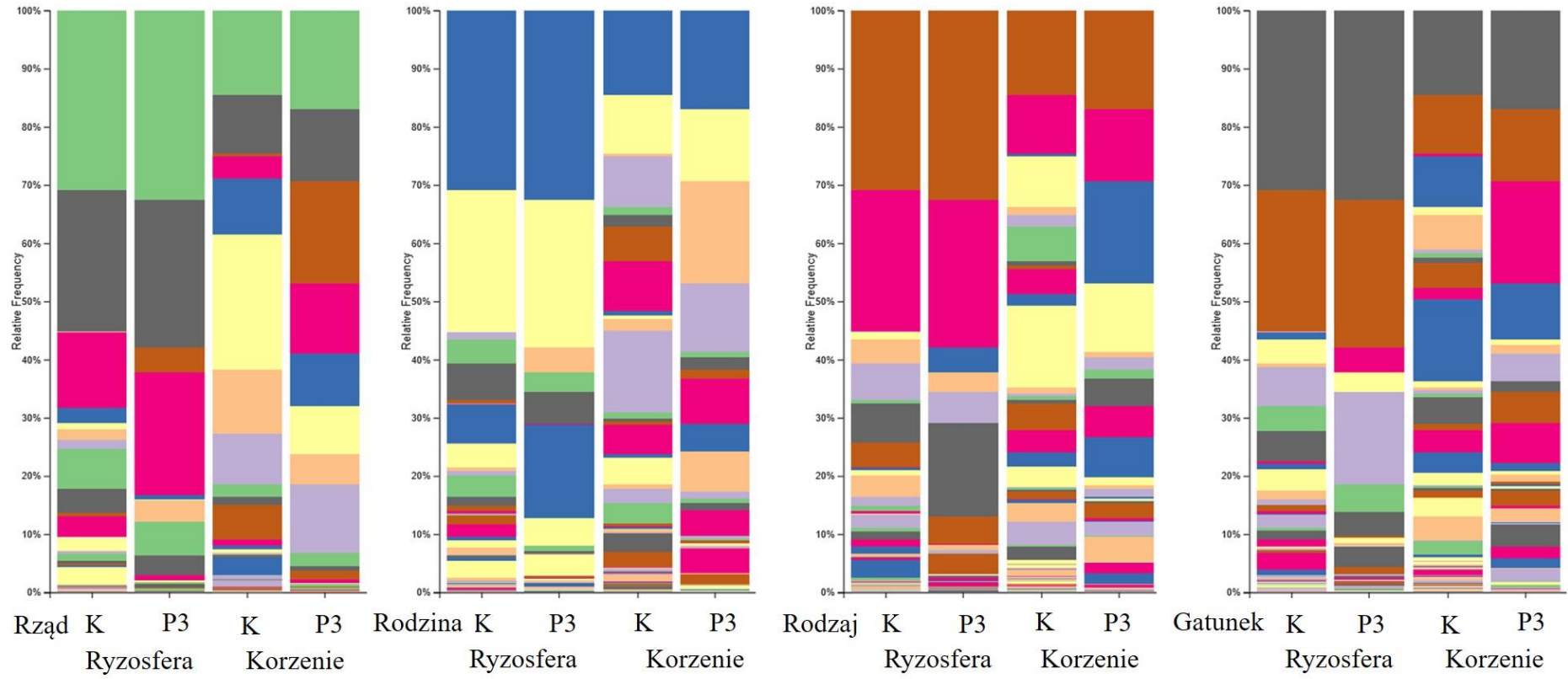


Fig. 18



Fig. 19



Fig. 20

SKRÓT OPISU

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego i nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania gleby oraz utrzymania i/lub poprawy właściwości biologicznych (zdrowia) gleby zapewniający utrzymanie i/lub poprawę i/lub ochronę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich wykazujący cechy biostymulacji roślin, zawierający szczepy bakteryjne z rodzaju *Bacillus*. Sposób charakteryzuje się tym, że stosuje się dwa wyselekcjonowane z gleby ryzosferowej bakteryjne izolaty środowiskowe *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, które nie wykazują wzajemnego antagonistycznego działania, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, zawieszane w płynnym nośniku organicznym albo suszone na sypkim nośniku albo liofilizowane na sypkim nośniku. Ponadto stosuje się nośnik właściwy w postaci serwatki korzystnie kwaśnej neutralizowanej, wzbogaconej otrębami pszennymi korzystnie durum, suchymi kwasami humusowymi, mielonymi nasionami gorczycy, olejem rzepakowym i olejkiem goździkowym dla postaci produktu suchej do aplikacji posypowej, która może być poddana procesowi peletowania tworząc pelet do kondycjonowania gleby, albo dla uzyskania postaci nawozowego produktu mikrobiologicznego do zawieszenia w wodzie i oprysku/podlewania serwatkę w proszku, otręby pszenne i olej rzepakowy zastępuje się dolomitem mikronizowanym, a dla uzyskania postaci do rozpuszczenia w wodzie i oprysku/podlewania, serwatkę w proszku, otręby pszenne i olej rzepakowy zastępuje się maltodekstryną.

(23 zastrzeżenia)