

# BacilHumus

**Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego i nawozowy produkt mikrobiologiczny do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów *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 utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby w uprawie owoców miękkich, zawierający szczepy bakteryjne *Bacillus* spp. o właściwościach antagonistycznych w stosunku do grzybów fitopatogenicznych z rodzaju: *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* oraz łęgniowców z rodzaju *Phytophthora*, a także zawierający składniki nośnika, w tym kwasy humusowe i/lub odciek po hodowli drożdży i/lub dolomit mikronizowany i/lub maltodekstrynę, w zależności od formy aplikacji bioproduktu, który wykazuje również cechy biostymulacji roślin.

Ze względu na to, że Polska należy do kluczowych na świecie producentów owoców miękkich, a w Unii Europejskiej jest liderem w produkcji truskawek ekologicznych (*FAOSTAT, GUS*), to wciąż istnieje potrzeba dostarczania odpowiednich narzędzi m.in. w postaci bioproduktów przeznaczonych do uprawy tych owoców. Uprawy owoców miękkich wymagają żyznych gleb, które charakteryzuje wysoka bioróżnorodność, a jednocześnie gleb zdrowych, w której odsetek patogenów jest niewielki (*Daugovish, O., Knapp, S., Gordon, T., Fennimore, S., Muramoto, J. and Bolda, M. (2021). Soil pest management in current California strawberry production: a review. Acta Hortic. 1309, 701-710, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1309.101>*). Należy również podkreślić, że zrównoważony sposób produkcji roślinnej zyskuje na popularności, a co więcej taki sposób produkcji roślinnej nakłada liczne ograniczenia na rolników, takie jak ograniczenie i/lub wręcz rezygnacja ze stosowania nawozów oraz chemicznych środków ochrony roślin na rzecz naturalnych rozwiązań, preparatów biologicznych i środków dopuszczonych do stosowania w rolnictwie ekologicznym (*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).*

Biopreparaty i bionawozy pełnią istotną rolę nie tylko w poprawie stanu gleb czy udostępnianiu roślinom składników pokarmowych, ale także odgrywają ważną funkcję w kontroli fitopatogenów zarówno w rolnictwie ekologicznym jak i konwencjonalnym (Mącik M., Gryta A., Frąc M. (2020). *Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. Advanc. Agron.* 162, 31-87, <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>). Typowe chemiczne rozwiązania stosowane w rolnictwie mogą powodować wyjaławianie gleb, zmniejszenie ilości materii organicznej oraz zmniejszenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych (Ju, X.-T., Xing, G.-X., Chen, X.-P., Zhang, S.-L., Zhang, L.-J., Liu, X.-J., Cui, Z.-L., Yin, B., Christie, P., and Zhu, Z.-L. (2009). *Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3041-3046; Zhang, Q.-C., Shamsi, I. H., Xu, D.-T., Wang, G.-H., Lin, X.-Y., Jilani, G., Hussain, N., and Chaudhry, A. N. (2012). *Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure. Applied Soil Ecology* 57, 1-8). Ograniczenie tego procesu to jeden z głównych celów Strategii na rzecz Bioróżnorodności 2030, a także podstawowe założenie rolnictwa regeneracyjnego (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*). Preparaty mikrobiologiczne coraz częściej wykorzystywane w rolnictwie mogą również stymulować systemiczną odporność roślin, poprawiać jakość mikrobiologiczną gleb oraz zwiększać dostępność mikro- i makroelementów dla roślin (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>).

Uprawy truskawki są narażone na choroby wywoływane przez fitopatogeny m.in. z rodzajów: *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* czy *Phytophthora*, które mogą powodować porażenia całych plantacji i usychanie roślin, tym samym obniżając ilość zebranych owoców i wywołując straty ekonomiczne (Malarczyk D., Panek J., Frąc M. (2019). *Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops – A Review. Molecules* 2019, 24, 1200; [doi:10.3390/molecules24071200](https://doi.org/10.3390/molecules24071200)). Strategia Unii Europejskiej na rzecz różnorodności biologicznej do roku 2030 koncentruje się na zwiększeniu powierzchni upraw

ekologicznych i ograniczeniu stosowania nawozów mineralnych i pestycydów (*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*), co sprawia, że nowe rozwiązania, w tym nawozowe produkty mikrobiologiczne dedykowane konkretnym uprawom są oczekiwane nie tylko przez rolników, ale również przez firmy nawozowe i producentów różnego typu bioproduktów dla rolnictwa i ogrodnictwa.

W obecnym stanie wiedzy opisano, że wśród bakterii z rodzaju *Bacillus* występują szczepy, które charakteryzują się zdolnościami antagonistycznymi przeciwko różnym fitopatogenom grzybowym, a także uczestniczą w udostępnianiu składników pokarmowych roślinom czy poprawie bioróżnorodności mikrobiologicznej gleb, jednakże nie jest to cecha oczywista i wyłonienie odpowiednich szczepów wymaga szeregu badań. Poniżej przedstawiono kilka przykładów wykorzystania szczepów *Bacillus* spp. do zastosowań rolniczych i ogrodniczych.

Rodzaj *Bacillus* jest intensywnie badaną grupą bakterii o dużym potencjale wykorzystania w rolnictwie, głównie ze względu na to, że mikroorganizmy należące do tego rodzaju występują niemal we wszystkich typach gleb, charakteryzują się dużą tolerancją na wysokie temperatury, szybko się namnażają w płynnych podłożach hodowlanych i należą do bakterii przetrwalnikujących. W 2006 Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych zarejestrowała ponad 10 różnych szczepów z rodzaju *Bacillus* jako biopestycydy i biofungicydy (*The United States Environmental Protection Agency, EPA, 2006*).

Przykładem wykorzystania szczepów z rodzaju *Bacillus* jest sucha formuacja preparatu zawierającego przetrwalniki suszone rozpyłowo 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*).

Izolaty *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) charakteryzowały się aktywnością celulolityczną. Preparat na bazie tych bakterii immobilizowanych na nośniku w postaci minerału glinokrzemianowego wykorzystywany jest do mineralizacji materii organicznej (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).

W celu zwalczania grzybowych chorób roślin został również wykorzystany szczep *Bacillus methylotrophicus* XT1 oraz XT2, który wykazywał się aktywnością antagonistyczną w stosunku do *Verticillium dahliae* oraz *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). Natomiast Abilio A. i in. (Abilio A., Knap I., De Freitas Zambelli L.S., Kompozycja nicieniobójcza zawierająca *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*, EP2603086) opracowali kompozycję nicieniobójczą zawierającą *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*.

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

Najczęściej patenty dotyczą biopreparatów wykorzystywanych do zwalczania patogenów roślin warzywnych i uprawnych, a brak jest rozwiązań, obejmujących nawozowe preparaty mikrobiologiczne działające na jakość mikrobiologiczną gleby przy jednoczesnym antagonistycznym oddziaływaniu na kluczowe patogeny grzybowe i grzybopodobne lęgniowce, przeznaczonych również do stosowania w ekologicznej uprawie owoców miękkich, lub są to rozwiązania obejmujące kontrolę pojedynczych patogenów np. z rodzaju *Botrytis*, nie stanowiąc kompleksowego rozwiązania dla czterech kluczowych fitopatogenów (*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium* spp.), utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby i wspomagania biostymulacji wzrostu roślin.

Brak jest też doniesień literaturowych i patentów odnośnie łącznego zastosowania mikroorganizmów na nośnikach złożonych z kwasów humusowych i/lub odcieku po hodowli drożdży i/lub dolomitu mikronizowanego i/lub maltodekstryny, w zależności od formy aplikacji bioproduktu nawozowego w biopreparatach i bioproduktach.

Celem wynalazku jest zatem opracowanie nawozowego produktu mikrobiologicznego do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby w uprawie owoców miękkich, wykazującego cechy istotne w kontroli grzybów fitopatogenicznych z rodzaju: *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* oraz lęgniowców z rodzaju *Phytophthora*, oraz ważne w 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 zapewniającego i/lub poprawiającego bioróżnorodność mikrobiologiczną gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych, dla upraw owoców miękkich, patogenów z rodzajów *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora*, jak również poprzez opracowanie kompozycji nawozowego produktu mikrobiologicznego. Przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania unikalnego, zoptymalizowanego składu podłoża płynnego do hodowli bakterii, nośników właściwych i innych ich 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 utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności gleby i/lub kontrolowania patogenów: *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazującego cechy biostymulacyjnego działania na rośliny, 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* sp. Sp115AD – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, zawieszzone w podłożu hodowlanym albo suszone na nośniku albo liofilizowane na nośniku;
- nośnik właściwy w postaci podłoża hodowlanego dla postaci płynnej albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie;

- dodatek płynnych kwasów humusowych i odcieku po produkcji drożdży dla postaci płynnej albo suchych kwasów humusowych dla postaci suchej jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

Korzystnie sposób obejmuje prowadzenie hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, w którym 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. Korzystnie stosuje się inokulum o transmitancji 90%, a hodowlę namnażającą prowadzi się przez 48 godzin.

Podłoże namnażające korzystnie zawiera w 1 litrze: 20 g serwatki, 6,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g NaCl, 0,022 g CaCl<sub>2</sub>, 0,18 g MgSO<sub>4</sub>, 12,9 mg FeCl<sub>2</sub>, w granicach ±10% każdego ze składników podłoża.

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

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

Korzystnie, po otrzymaniu miana hodowli namnażającej nie mniejszego niż 10<sup>9</sup> jtk/ml przeprowadza się etap indukcji przetrwalnikowania. Proces ten prowadzi się korzystnie poprzez obniżenie pH pożywki hodowlanej kwasem mlekowym do pH 5,0-5,5 i po 48 godzinach hodowli i wytworzeniu przetrwalników przez komórki bakteryjne hodowlę pasteryzuje się poprzez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut. Otrzymaną zawiesinę przetrwalników stosuje się jako główny komponent nawozowego produktu mikrobiologicznego.

Po zakończeniu hodowli, jako komponent nośnika dodaje się kwasy humusowe, które w zależności od formulacji produktu mają postać płynną albo suchą.

Jako nośnik bakterii dla postaci płynnej stosuje się namnażające podłoże hodowlane otrzymane poprzez połączenie 390-410 ml zawiesiny przetrwalników każdego szczepu bakteryjnego: *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\* o nr 1 i 2 na liście sekwencji i 45-55 ml płynnych kwasów humusowych oraz 145-155 ml odcieku po hodowli drożdży.

Otrzymaną postać płynną poddaje się korzystnie stabilizacji zabezpieczającej przed rozwojem przetrwalników poprzez obniżenie odczynu preparatu do pH=4,0-4,5. Preferowane jest w tym celu zastosowanie kwasu mlekowego.

W wariacie dla uzyskania postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie zawiesinę przetrwalników poddaje się suszeniu rozpyłowemu na serwatce w proszku albo liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku, jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych

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

Korzystnie do postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się suche kwasy humusowe w ilości 0,55-0,65 g/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów stosuje się dolomit mikronizowany, stanowiący dopełnienie do 1 kg produktu.

W wariacie dla uzyskania postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie, jako krioprotektant bakterii w procesie suszenia rozpyłowego albo liofilizacji oraz nośnik wszystkich komponentów nawozowego produktu mikrobiologicznego, stosuje się maltodekstrynę, a wysuszone/liofilizowane bakterie 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.

Korzystnie do postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się suche kwasy humusowe w ilości 0,55-0,65 g/kg nawozowego produktu mikrobiologicznego, a maltodekstryna jako krioprotektant bakterii i nośnik właściwy stanowi dopełnienie do 1 kg.

Istota nawozowego produktu mikrobiologicznego do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich, wykazujący cechy biostymulacyjnego działania na rośliny, zawierający szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, **polega na tym**, że zawiera dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, nośnik właściwy w postaci podłoża hodowlanego dla postaci płynnej produktu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie oraz zawiera dodatek płynnych kwasów humusowych i odcieku po hodowli drożdży jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego dla postaci płynnej albo dodatek suchych kwasów humusowych dla postaci suchej rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wodzie. Izolaty bakteryjne wyhodowane są na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie i zawieszony na nośniku albo suszony na nośniku albo liofilizowany na nośniku.

Nawozowy produkt mikrobiologiczny zawiera szczepy bakteryjne korzystnie w równym stosunku wagowym dla postaci suchej albo w równym stosunku objętościowym dla postaci płynnej.

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

Korzystnie koncentracja każdego ze szczepów bakteryjnych jest w postaci płynnej w zakresie  $10^8 - 10^{11}$  jtk/ml.

Korzystnie postać płynna zawiera w 1 litrze 45-55 ml dodatku płynnych kwasów humusowych oraz 145-155 ml dodatku odcieku po hodowli drożdży.

W wariacie produktu w postaci suchej rozpuszczalnej albo nierozpuszczalnej w wodzie koncentracja każdego ze szczepów bakteryjnych jest korzystnie w zakresie  $10^8 - 10^{11}$  jtk/g.

Korzystnie postać produktu sucha rozpuszczalna albo nierozpuszczalna w wodzie zawiera Korzystnie postać sucha nierozpuszczalna w wodzie zawiera serwatkę sproszkowaną jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i dolomit mikronizowany jako nośnik właściwy.

Korzystnie postać sucha rozpuszczalna w wodzie zawiera maltodekstrynę jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i jako nośnik właściwy.

Szczepy *Bacillus* spp. (Sp115AD oraz Sp116AC\*), wykorzystane do opracowania produktu nawozowego są izolatami środowiskowymi i zostały wyselekcjonowane w Instytucie Ogrodnictwa (IO) w Skierniewicach i ujawnione w kolekcji SYMBIO BANK tego Instytutu.

Otrzymany nawozowy produkt mikrobiologiczny w formie płynnej i suchej umożliwia utrzymanie i/lub poprawę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby 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 produktów 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 produktu na środowisko glebowe i roślinę, dając podstawy dla uznania opracowanego bioproduktu za nawozowy produkt mikrobiologiczny. Produkt stosuje się dolistnie (poprzez opryskiwanie bądź zraszanie) lub/i pod roślinę poprzez podlewanie, przy czym w przypadku formulacji suchej należy uprzednio sporządzić zawiesinę produktu w wodzie, korzystnie 2-5 kg produktu (o koncentracji bakterii  $10^9$  jtk/g) na 700-800 l niechlorowanej wody na 1 ha uprawy.



W korzystnym sposobie utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby lub/i korzeni lub/i cech istotnych dla biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin lub/i kontroli patogenów roślin produkt stosuje się w ilości korzystnie 5-10 l/ha ( $10^9$  jtk/l) dla preparatu płynnego, przy czym produkt korzystnie można rozcieńczyć wodą w zależności od potrzeb lub 2-5 kg/ha do zawieszenia w wodzie wprowadzając go bezpośrednio na i/lub pod korzenie roślin przy zakładaniu nowych plantacji, lub/i poprzez oprysk dolistny i/lub naglebowy i/lub doglebowy w przypadku istniejących plantacji, preparatu zawierającego co najmniej  $10^9$  jtk/g bakterii wyizolowanych z ryzosfery roślin według kompozycji i/lub produktu, przy czym w postaci podlewania i/lub oprysku/zraszania/irygacji produkt można korzystnie rozcieńczyć wodą w zależności od potrzeb.

Wynalazek został uwidoczniony w przykładach wykonania na rysunku, gdzie:

**Fig.1** przedstawia wygląd kolonii szczepów bakteryjnych Sp115AD i Sp116AC\* 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 bakteryjnych będących składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego, 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 produktu płynnego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\* wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*;

**Fig.9** przedstawia tabelę dotyczącą antagonizmu nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\* w postaci płynnej, suchej nierozpuszczalnej w wodzie oraz suchej rozpuszczalnej w wodzie, wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*;

**Fig.10** przedstawia antagonizm nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\* w postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie (nośnik – maltodekstryna) wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora* po 1 miesiącu przechowywania produktu w temperaturze 35°C;

**Fig.11** przedstawia antagonizm nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\* w postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie (nośnik – dolomit mikronizowany) wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora* po 3 miesiącach przechowywania produktu w temperaturze pokojowej (około 21°C), 35°C oraz 4°C;

**Fig.12** przedstawia antagonizm nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\* w postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie (nośnik – dolomit mikronizowany) wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora* po 6 miesiącach przechowywania produktu w temperaturze pokojowej (około 21°C);

**Fig.13** przedstawia efektywną liczbę gatunków (ENS) bakterii w ryzosferze malin po zastosowaniu nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.14** przedstawia efektywną liczbę gatunków (ENS) grzybów w korzeniu roślin maliny po zastosowaniu nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.15** przedstawia względny skład procentowy grup troficznych grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego

zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.16** 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* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.17** przedstawia względną obfitość typów bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.18** przedstawia względną obfitość klas bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.19** przedstawia względną obfitość rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.20** przedstawia względną obfitość typów grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.21** przedstawia względną obfitość klas grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*;

**Fig.22** przedstawia względną obfitość rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\*.

## PRZYKŁADY

**Przykład 1. Identyfikacja oraz charakterystyka biochemiczna szczepów bakterii będących składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego do utrzymania i/lub poprawy jakości i/lub bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich**

Dwa szczepy bakteryjne wybrane do wykorzystania w nawozowym produkcie mikrobiologicznym, wyselekcjonowane z gleby ryzosferowej, pochodzące z kolekcji SYMBIO BANK Instytutu Ogrodnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach, zostały zidentyfikowane do rodzaju na podstawie amplifikacji genu 16S rDNA oraz sekwencjonowania metodą Sanger. Otrzymane sekwencje nukleotydowe zostały przeanalizowane za pomocą narzędzi bioinformatycznych poprzez porównanie ich z sekwencjami nukleotydowymi znajdującymi się w komercyjnej bazie danych MicroSeq<sup>LD</sup> oraz w otwartej bazie danych NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Szczepy bakterii wybrane do wytworzenia produktu charakteryzują się również właściwościami metabolicznymi, które pozytywnie wpływają na właściwości środowiska glebowego, funkcjonowanie bioróżnorodności, jak również uczestniczą w procesach udostępniania związków mineralnych dla roślin.

Składające się na produkt szczepy bakterii Sp115AD – sekwencja nr 1 i Sp116AC\* – sekwencja nr 2, zostały zidentyfikowane do rodzaju *Bacillus*, uzyskane sekwencje nukleotydowe przedstawiono na Liście Sekwencji. Zidentyfikowane szczepy *Bacillus* posiadają korzystne właściwości metaboliczne, które wpływają na bioróżnorodność mikrobiologiczną środowiska glebowego, ograniczając wzrost i rozprzestrzenianie fitopatogenów grzybowych, a także uczestniczą w procesach udostępniania związków odżywczych dla roślin. Szczepy bakteryjne charakteryzują się bardzo dobrym wzrostem o jasnokremowym zabarwieniu na podłożu PCA (Fig.1). 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 Sp115AD oraz Sp116AC\* 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). Ponadto szczepy bakteryjne zostały scharakteryzowane pod względem podstawowej aktywności enzymatycznej za pomocą testu biochemicznego API ZYM (Biomérieux). Określono aktywność enzymów hydrolitycznych tj. fosfataz, esteraz, arylamidaz, fosfohydrolazy,  $\beta$ -glukozydazy,  $\beta$ -galaktozydazy, mannozydazy, glukozaminidazy

szczepów bakteryjnych stanowiących komponenty nawozowego produktu mikrobiologicznego (Fig.6). Szczep *Bacillus* sp. Sp115AD, charakteryzował się wysoką aktywnością esterazy, esterazy lipazy, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI, natomiast szczep *Bacillus* sp. Sp116AC\* charakteryzował się wysoką aktywnością fosfohydrolazy naftylo-AS-BI oraz średnią lub niewielką aktywnością esterazy, fosfatazy alkalicznej, esterazy lipazy,  $\alpha$ -chymotrypsyny, kwaśnej fosfatazy,  $\alpha$ -galaktozydazy i  $\beta$ -glukozydazy (Fig.7).

***Przykład 2. Określenie antagonizmu szczepów z rodzaju Bacillus wchodzących w skład nawozowego produktu mikrobiologicznego wobec roślinnych patogenów grzybowych i grzybopodobnego lęgniowca – eksperyment szalkowy***

Zdolności antagonistyczne nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego konsorcjum szczepów z rodzaju *Bacillus*: *Bacillus* sp. Sp115AD oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\*, będących głównymi składnikami produktu, określono w stosunku do izolatów środowiskowych patogenów, wyizolowanych z ekologicznych plantacji owoców miękkich w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki PAN. Badania antagonizmu bakterii przeprowadzono wobec następujących grzybów: *Botrytis* sp. (G277/18 i/lub G276/18), *Verticillium* sp. (G297/18 i/lub G296/18), *Colletotrichum* sp. (G 166/18 i/lub G171/18) oraz grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora* sp. (G408/18 i/lub G184/21).

Antagonizm określano na płytkach Petriego o średnicy 90 mm, na podłożu agarowym PDA (Plate Dextrose Agar). Całe podłoże na płytce inokulowano 300  $\mu$ l lub 100  $\mu$ l zawiesiny zarodników fitopatogenu, o transmitancji 70%, następnie na środek płytki wykładano jałowy krążek bibuły o średnicy 5 mm, nasączony zawiesiną bakteryjnego produktu zawierającego szczepy wyselekcjonowanych bakterii: *Bacillus* sp. Sp115AD oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\*. Płytki inkubowano w temperaturze 27°C, przez 5-7 dni i dokonywano pomiaru stref zahamowania wzrostu grzybni lub/i zahamowania zarodnikowania (Fig.8-Fig.9). Przeprowadzono też 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 na różnych nośnikach – płynnym (podłoże hodowlane), nierozpuszczalnym w wodzie (dolomit mikronizowany) oraz rozpuszczalnym w wodzie (maltodekstryna). Uzyskane wyniki wskazują, że właściwości antagonistyczne opracowanych formułacji produktu 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-Fig.12). Najlepsze właściwości antagonistyczne po 1 miesiącu przechowywania nawozowego produktu mikrobiologicznego, w którym bakterie immobiolizowane były na maltodekstrynie uzyskano wobec grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora* sp., wykazując właściwości biobójcze i niedopuszczając do rozwoju tego patogenu, a dla badanych fitopatogenów grzybowych zaobserwowano działanie fungistatyczne bioproduktu, objawiające się hamowaniem zarodnikowania grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* (Fig.10). Najlepsze właściwości antagonistyczne po 6 miesiącach przechowywania produktu odnotowano dla preparatu na nośniku – dolomicie mikronizowanym, który był skuteczny w stosunku do fitopatogenów z rodzaju *Phytophthora*, *Botrytis* i *Verticillium*, wykazując właściwości biobójcze i niedopuszczając do rozwoju tych patogenów, a także fungistatyczne, objawiające się hamowaniem zarodnikowania grzybów z rodzaju *Colletotrichum* (Fig.12).

### ***Przykład 3. Określenie liczebności bakterii w nawozowym produkcie mikrobiologicznym***

Liczebność bakterii w przygotowanym nawozowym produkcie mikrobiologicznym określono poprzez zliczenie i określenie ogólnej liczebności bakterii metodą wysiewu rozcieńczeń. Z szeregu rozcieńczeń bioproduktu 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 pożywki po czym inkubowano w temperaturze  $26^{\circ}\text{C}$ , przez 72 godziny. Wyrosłe kolonie zliczono i wyznaczono ogólną liczebność bakterii w postaci płynnej bioproduktu (jtk/ml) oraz w formulacjach suchych nawozowego produktu mikrobiologicznego (jtk/g).

W preparacie po wytworzeniu wykazano ogólną liczebność bakterii na poziomie  $>10^9$  jtk/ml produktu bakteryjnego w postaci płynnej oraz  $>10^9$  jtk/g produktu bakteryjnego w postaci suchej rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wodzie. Wyniki badań przechowalniczych wykazały na utrzymywanie się w preparacie bakteryjnym liczebności na poziomie  $>10^8$  jtk/g lub  $>10^8$  jtk/ml, a nawet  $>10^9$  jtk/g 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 na powierzchnię korzeni, a kombinację kontrolną stanowiły rośliny nietraktowane preparatem, rosące w podłożu z dodatkiem 5 g suszonego obornika na doniczkę. W przykładzie wykonania produkt zastosowano w formie płynnej. 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 wskaźników bioróżnorodności, w tym efektywnej liczby gatunków (ENS) bakterii i grzybów w ryzosferze oraz korzeniach roślin traktowanych i nietraktowanych produktem. Nawozowy produkt mikrobiologiczny spowodował zwiększenie bioróżnorodności bakterii w ryzosferze w stosunku do kontroli (Fig.13) oraz zachowanie bioróżnorodności grzybów na poziomie wariantu kontrolnego. Ponadto produkt spowodował zwiększenie ENS grzybów zasiedlających korzeń w stosunku do próbek kontrolnych korzeni nietraktowanych produktem (Fig.14). Dokonano również analizy grup troficznych i gildii funkcjonalnych grzybów z wykorzystaniem bazy danych FunGuild. Wyniki te wykazały, że w korzeniu roślin traktowanych nawozowym produktem mikrobiologicznym zaobserwowano obniżenie grupy patotrofów oraz trybów mieszanych: patotrofów-symbiotrofów i patotrofów-saprotrofów-symbiotrofów, a także odnotowano zwiększenie saprotrofów oraz symbiotrofów w korzeniu. Wykazano również zwiększenie symbiotrofów oraz sapro-symbiotrofów w ryzosferze malin traktowanych nawozowym produktem mikrobiologicznym, a także obniżenie trybu mieszanego patotrof-saprotrof-symbiotrof (Fig.15). Dodatkowo wykazano, że w po aplikacji produktu zmniejszyła się ilość gildii przypisanych do patogenów roślin (Fig.16). Analiza wyników uzyskanych dla zbiorowisk bakterii wykazała na ogół zwiększenie względnej obfitości bakterii na różnych poziomach taksonomicznych po zastosowaniu produktu. Efekt ten odnotowano zarówno w glebie ryzosferowej, jak również korzeniu (Fig.17-Fig.19). 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, co może wskazywać na ochronne działanie nawozowego produktu mikrobiologicznego, ograniczając wnikanie, zwłaszcza niekorzystnych dla roślin grzybów (Fig.20-Fig.22).

Zaletą nawozowego produktu mikrobiologicznego jest jego duża uniwersalność, potwierdzona tym, że jest on dedykowany do 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.

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

W celu określenia wpływu nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus* sp. Sp115AD oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* 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 dwóch sposobach uprawy nawadnianym i nienawadnianym w ekologicznym systemie produkcji. Dodatkowo testy opracowanego nawozowego produktu mikrobiologicznego, wprowadzonego jako jeden z elementów technologii produkcji malin ekologicznych, prowadzono w oparciu o doświadczenie z czterema odmianami malin: Delniwa, Enrosadira, Rosalita i Poemat. W doświadczeniach testowana była zarówno formuła płynna, jak i sucha nierozpuszczalna w wodzie produktu bakteryjnego. 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 płynnej, a w drugim w formie suchej nierozpuszczalnej w wodzie, zaobserwowano



największą zwyżkę plonu truskawki. Zaobserwowano, że u odmiany Honeoye w obiekcie nienawadnianym, w wariacie, w którym zastosowano dodatek produktu bakteryjnego, zmniejszyło się porażenie antraknozą. Odmiana Vibrant zareagowała natomiast zmniejszeniem porażenia skórzastą zgnilizną owoców truskawki. Wyniki wskazują, że dla niektórych odmian maliny, zwłaszcza Enrosadira i Rosalita, zaobserwowano zwiększenie aktywności metabolicznej mikroorganizmów występujących w roślinie i owocu, w szczególności w stosunku do węglowodanów, w wariacie w którym jako jeden z elementów uprawy zastosowany był opracowany produkt bakteryjny. Ogólny wskaźnik różnorodności mikrobiologicznej gleby uległ podwyższeniu w wariacie, w którym włączono aplikację opracowanego produktu bakteryjnego.

### ***Przykład 6. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formuacja płynna***

Do otrzymania nawozowego produktu mikrobiologicznego do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby 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* sp. Sp115AD – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* – 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0,5g/L NaCl, serwatkę kwaśną neutralizowaną w ilości 20 g/L, CaCl<sub>2</sub> w ilości 0,022 g/L, MgSO<sub>4</sub> w ilości 0,18g/L, FeCl<sub>2</sub> w ilości 12,9 mg oraz 10 ml roztworu mikroelementów zawierającego: 0,5mM MnCl<sub>2</sub>\*4 H<sub>2</sub>O, 1,2 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,27 mM CuCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O, 0,23 mM CoCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O, 0,23 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2 H<sub>2</sub>O. Po otrzymaniu miana hodowli namnażającej przeprowadzono etap indukcji przetrwalnikowania poprzez zmianę warunków hodowli, obejmującą obniżenie pH pożywki hodowlanej za pomocą kwasu mlekowego do pH 5,0-5,5. Po 48 godzinach hodowli hodowle pasteryzowano poprzez

inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut. Tak przygotowana zawiesina przetrwalników była głównym z komponentów nawozowego produktu mikrobiologicznego.

Do hodowli bakteryjnej (zawiesiny przetrwalników) dodawano komponenty nośnika w postaci płynnych kwasów humusowych oraz odcieku po hodowli drożdży. Po połączeniu składników przygotowany produkt zabezpieczono przed rozwojem przetrwalników w komórki wegetatywne (stabilizowano) poprzez zmianę odczynu, obniżając pH nawozowego produktu mikrobiologicznego za pomocą kwasu mlekowego do 4,0-4,5.

***Przykład 7. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formułacja sucha nierozpuszczalna w wodzie suszona rozpyłowo***

Sposób prowadzono jak w Przykładzie 6., z tym że po zakończeniu hodowli, dla uzyskania nierozpuszczalnej w wodzie formułacji suchej do oprysku bądź podlewania, hodowle poddano suszeniu rozpyłowemu na serwatce w proszku, jako nośnik wysuszonych na serwatce bakterii zamiast płynnego podłoża hodowlanego z płynnymi kwasami humusowymi oraz odciekiem po produkcji drożdży zastosowano nośnik w postaci dolomitu mikronizowanego z dodatkiem suchych kwasów humusowych.

***Przykład 8. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – nierozpuszczalna w wodzie formułacja sucha zawierająca liofilizowane szczepy bakterii***

Otrzymany sposobem opisanym w Przykładzie 7. nawozowy produkt mikrobiologiczny do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich, posiadał analogiczny skład jak wskazano w Przykładzie 7, z tym że zamiast suszenia rozpyłowego hodowle bakteryjne poddano liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów.

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

Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego prowadzono jak w Przykładzie 7., z tym że hodowle poddano suszeniu rozpyłowemu na maltodekstrynie zamiast na serwatce w proszku, dla uzyskania rozpuszczalnej formułacji suchej do oprysku lub zraszania, a jako nośnik wysuszonych na maltodekstrynie bakterii zamiast dolomitu

mikronizowanego z dodatkiem suchych kwasów humusowych zastosowano nośnik w postaci maltodekstryny z dodatkiem suchych kwasów humusowych.

***Przykład 10. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – rozpuszczalna w wodzie formacja sucha zawierająca liofilizowane szczepy bakterii***

Nawozowy produkt mikrobiologiczny otrzymany sposobem według Przykładu 9. posiada skład analogiczny jak w przykładzie 9., z tym że zamiast suszenia rozpyłowego na maltodekstrynie, stosuje się liofilizację z dodatkiem maltodekstryny jako krioprotektanta.

1. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby pozwalającego jednocześnie na kontrolę fitopatogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazującego cechy biostymulacyjnego działania na rośliny, 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* sp. Sp115AD – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, zawieszane w podłożu hodowlanym albo suszone na nośniku albo liofilizowane na nośniku;
- nośnik właściwy w postaci podłoża hodowlanego dla postaci płynnej albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie;
- dodatek płynnych kwasów humusowych i odcieku po produkcji drożdży dla postaci płynnej albo suchych kwasów humusowych dla postaci suchej 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, w którym 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: 20g serwatki, 6,6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5g NaCl, 0,022g CaCl<sub>2</sub>, 0,18g MgSO<sub>4</sub>, 12,9mg FeCl<sub>2</sub>, 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  $10^9$  jtk/ml przeprowadza się etap indukcji przetrwalnikowania, korzystnie poprzez obniżenie pH pożywki hodowlanej kwasem mlekowym do pH 5,0-5,5 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 z zastrz. 2-8, **znamienny tym**, że po zakończeniu hodowli, jako komponent nośnika dodaje się kwasy humusowe, które w zależności od formulacji produktu mają postać płynną albo suchą.
10. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że jako nośnik bakterii dla postaci płynnej stosuje się namnażające podłoże hodowlane otrzymane poprzez połączenie 390-410 ml zawiesiny przetrwalników każdego szczepu bakteryjnego: *Bacillus* sp. Sp115AD i *Bacillus* sp. Sp116AC\* o nr 1 i 2 na liście sekwencji i 45-55 ml płynnych kwasów humusowych oraz 145-155 ml odcieku po hodowli drożdży.
11. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że otrzymaną postać płynną poddaje się stabilizacji zabezpieczającej przed rozwojem przetrwalników poprzez obniżenie odczynu preparatu do pH=4,0-4,5.
12. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 11, **znamienny tym**, że stosuje się kwas mlekowy.
13. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-9, **znamienny tym**, że dla uzyskania postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie zawiesinę przetrwalników poddaje się suszeniu rozpyłowemu na serwatce w proszku albo liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku, jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów, uzyskując liofilizaty bakteryjne o koncentracji nie mniejszej niż

$10^{11}$  jtk/g, a wysuszone albo liofilizowane bakterie dodaje się w równych ilościach do uzyskania produktu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie  $10^8 - 10^{11}$  jtk/g.

14. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-9, albo 13, **znamienny tym**, że do postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się suche kwasy humusowe w ilości 0,55-0,65 g/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów stosuje się dolomit mikronizowany, stanowiący dopełnienie do 1 kg produktu.

15. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-9, **znamienny tym**, że dla uzyskania postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie, jako krioprotektant bakterii w procesie suszenia rozpyłowego albo liofilizacji oraz nośnik wszystkich komponentów nawozowego produktu mikrobiologicznego, stosuje się maltodekstrynę, a wysuszone/liofilizowane bakterie 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.

16. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-9, albo 15, **znamienny tym**, że do postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się suche kwasy humusowe w ilości 0,55-0,65 g/kg nawozowego produktu mikrobiologicznego, a maltodekstryna jako krioprotektant bakterii i nośnik właściwy stanowi dopełnienie do 1 kg.

17. Nawozowy produkt mikrobiologiczny do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich, wykazujący cechy biostymulacyjnego działania na rośliny, zawierający szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, **znamienny tym**, że zawiera dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, nośnik właściwy w postaci podłoża hodowlanego dla postaci płynnej produktu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie oraz zawiera dodatek płynnych kwasów humusowych i odcieku po hodowli drożdży jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego dla postaci płynnej albo dodatek suchych kwasów humusowych dla postaci suchej rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wodzie, przy czym izolaty bakteryjne wyhodowane są na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie i zawieszony na nośniku albo suszony na nośniku albo liofilizowany na nośniku.

18. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 17, **znamienny tym**, że zawiera szczepy bakteryjne *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, w równym stosunku wagowym dla postaci suchej albo w równym stosunku objętościowym dla postaci płynnej..
19. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 17 albo 18, **znamienny tym**, że izolaty bakteryjne wyhodowane są na podłożu namnażającym z serwatką w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.
20. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 17 - 19, **znamienny tym**, że koncentracja każdego ze szczepów bakteryjnych jest w postaci płynnej w zakresie  $10^8$  –  $10^{11}$  jtk/ml.
21. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 17 - 20, **znamienny tym**, że jego postać płynna zawiera w 1 litrze 45-55 ml dodatku płynnych kwasów humusowych oraz 145-155 ml dodatku odcieku po hodowli drożdży.
22. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 17 - 19, **znamienny tym**, że koncentracja każdego ze szczepów bakteryjnych jest w postaci suchej rozpuszczalnej albo nierozpuszczalnej w wodzie w zakresie  $10^8$  –  $10^{11}$  jtk/g.
23. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 17, 18, 19 albo 22, **znamienny tym**, że jego postać sucha rozpuszczalna albo nierozpuszczalna w wodzie zawiera w 1 kg dodatek suchych kwasów humusowych w ilości 0,55-0,65 g.
24. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 17, 18, 19, 22 albo 23, **znamienny tym**, że ma postać suchą nierozpuszczalną w wodzie i zawiera serwatkę sproszkowaną jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i dolomit mikronizowany jako nośnik właściwy.
25. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 17, 18, 19, 22 albo 23, **znamienny tym**, że ma postać suchą rozpuszczalną w wodzie i zawiera maltodekstrynę jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i jako nośnik właściwy.



Fig. 1





Fig. 2

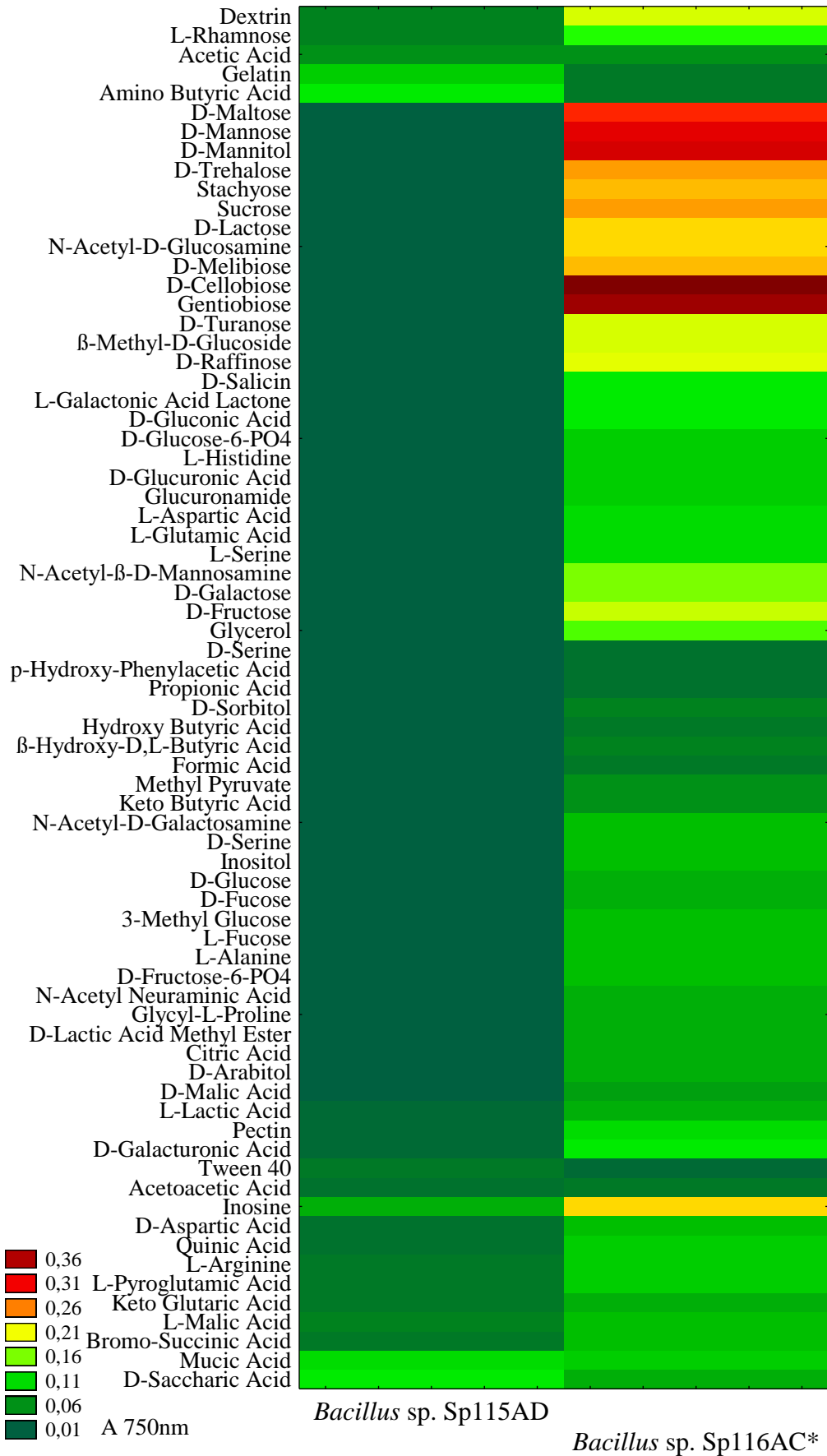


Fig. 3

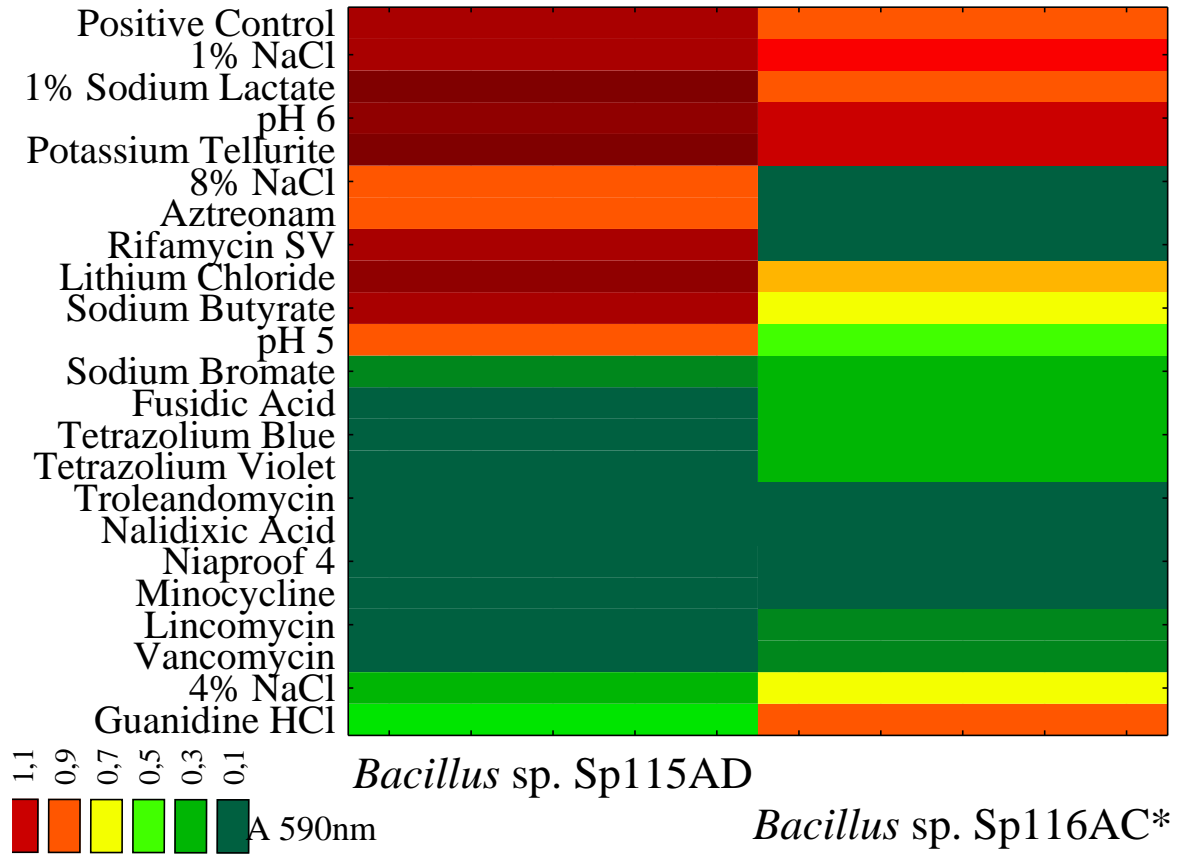


Fig. 4

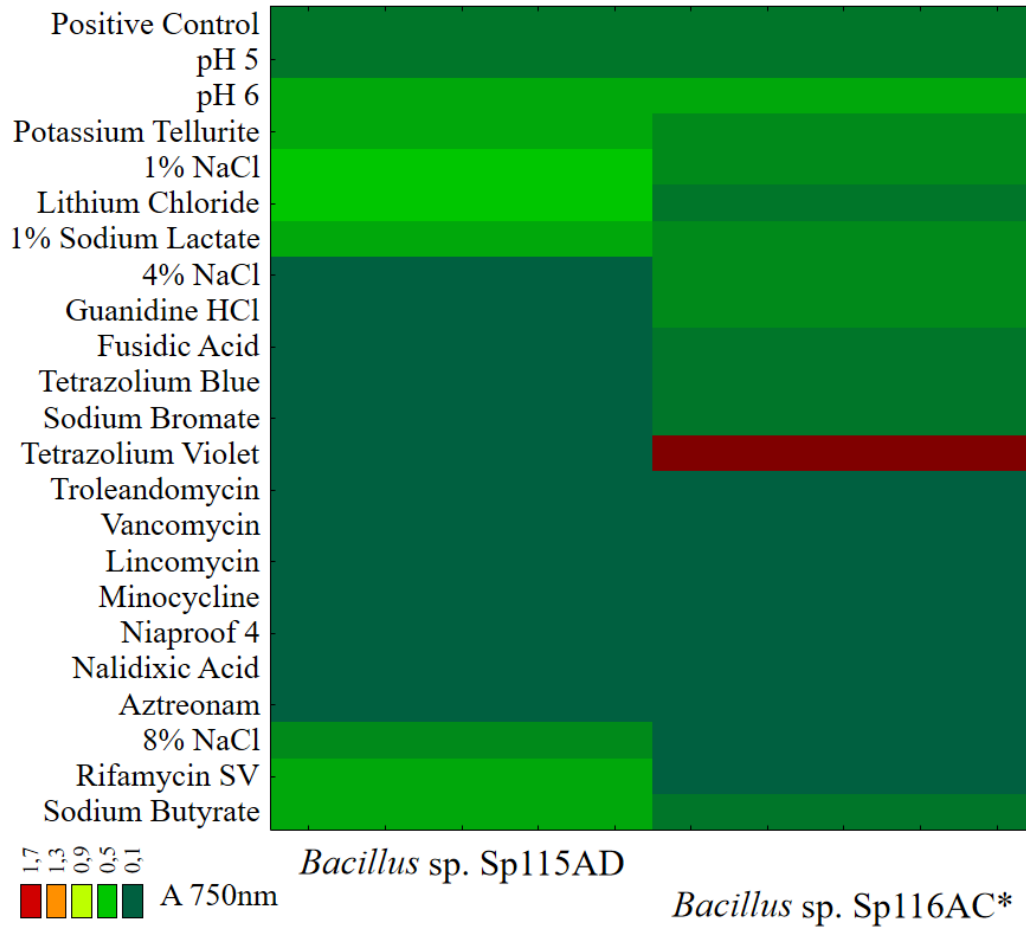


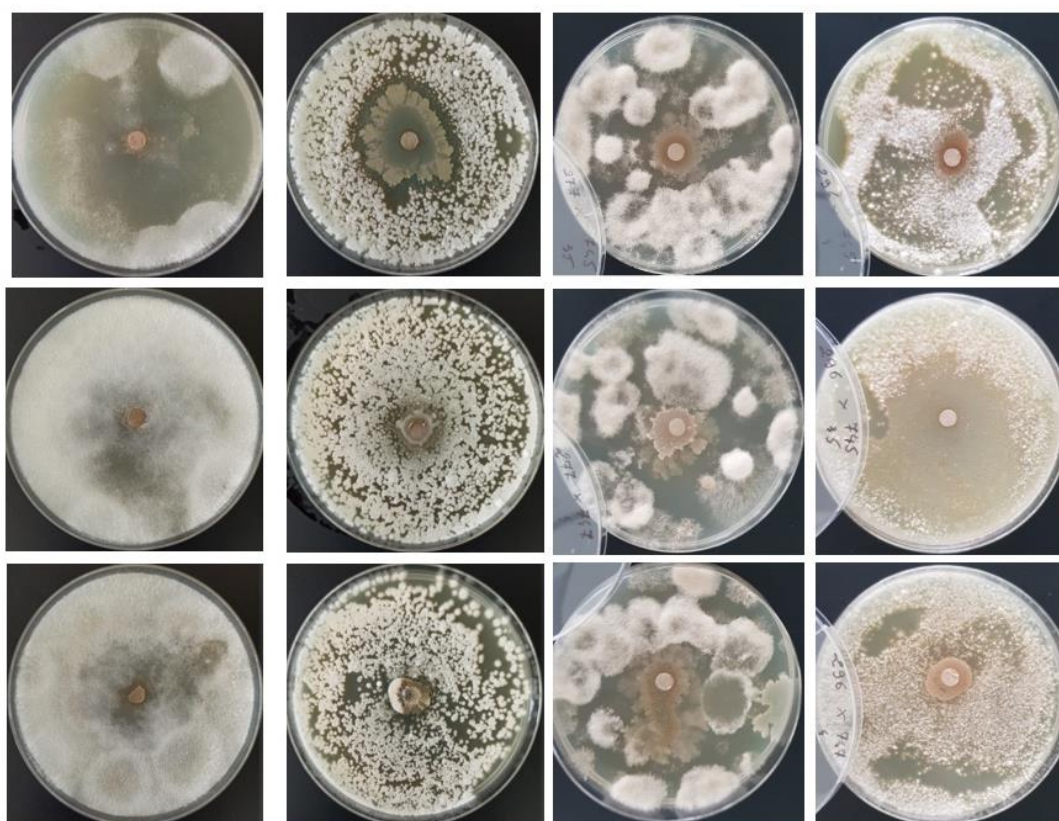
Fig. 5



Fig. 6

<b>Aktywność enzymatyczna</b>	<b>Zastosowany substrat</b>	<b><i>Bacillus sp.</i> Sp115AD</b>	<b><i>Bacillus sp.</i> Sp116AC*</b>
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	-	-
$\alpha$ - chymotrypsyna	N-glutarylo-feniloalanino-2-naftylamid	-	+
Kwaśna fosfataza	2-naftylo-fosforan	++	+
Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI	Naftylo-AS-BI-fosforan	+++	+++
$\alpha$ - galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- $\alpha$ D-galaktopiranosyd	-	+
$\beta$ - galaktozydaza	2-naftylo- $\beta$ D-galaktopiranosyd	-	++
$\beta$ - glukuronidaza	Naftylo-AS-BI- $\beta$ D- glukuronid	-	-
$\alpha$ - glukozydaza	2- naftylo- $\alpha$ D- glukopiranozyd	++	-
$\beta$ - glukozydaza	6-Br-2-naftylo- $\beta$ D-galaktopiranozyd	++	++
N-acetylo- $\beta$ -glukozaminidaza	1- naftylo-N- acetyl- $\beta$ D-glukozaminid	-	-
$\alpha$ - mannozydaza	6-Br-2-naftylo- $\alpha$ D-mannopiranozyd	-	-
$\alpha$ - fukozydaza	2- naftylo- $\alpha$ L- fukopiranozyd	-	-

Fig. 7



*Phytophthora* spp.  
G408/18

*Colletotrichum* spp.  
G171/18

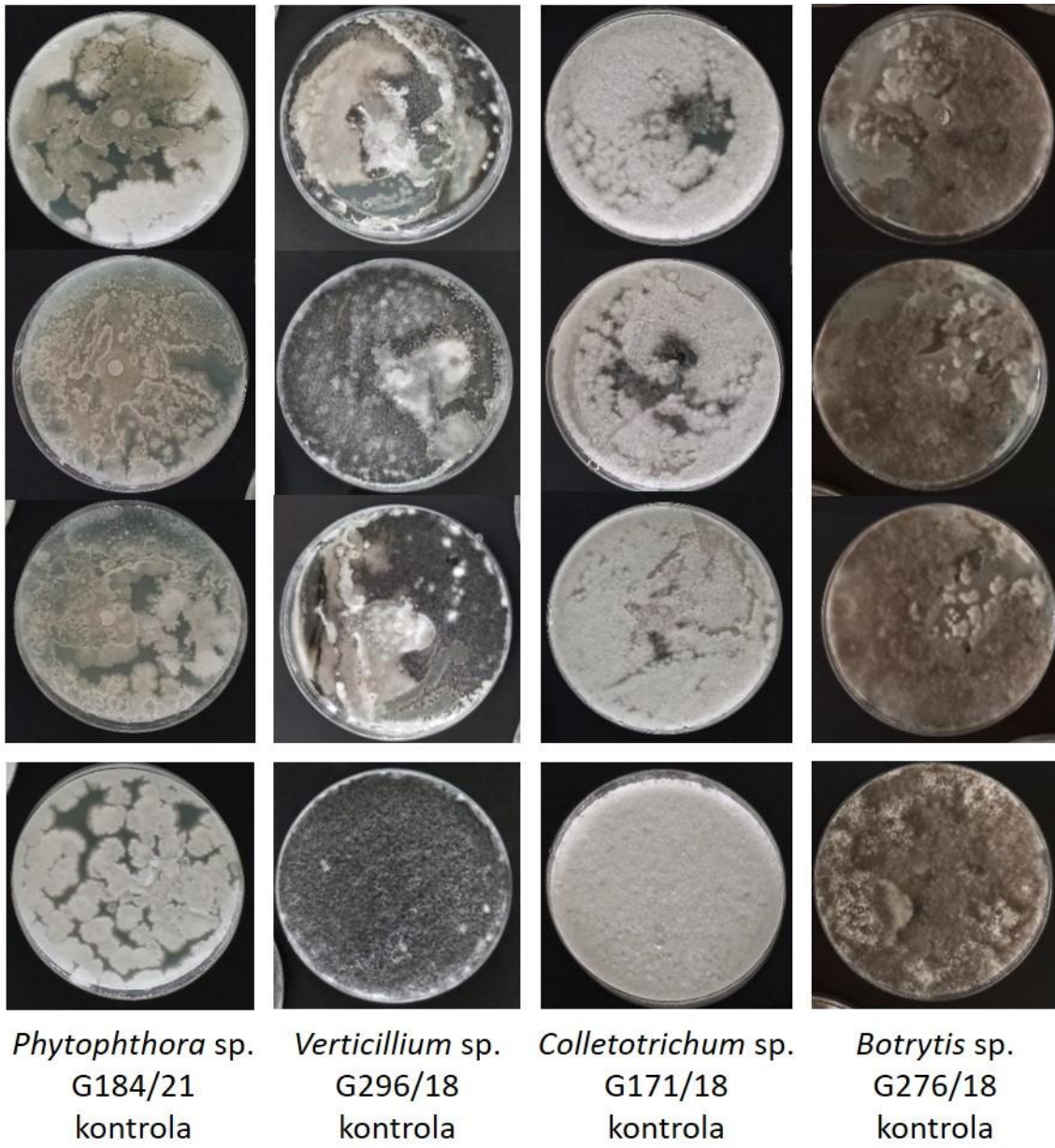
*Botrytis* spp.  
G277/18

*Verticillium* spp.  
G296/18

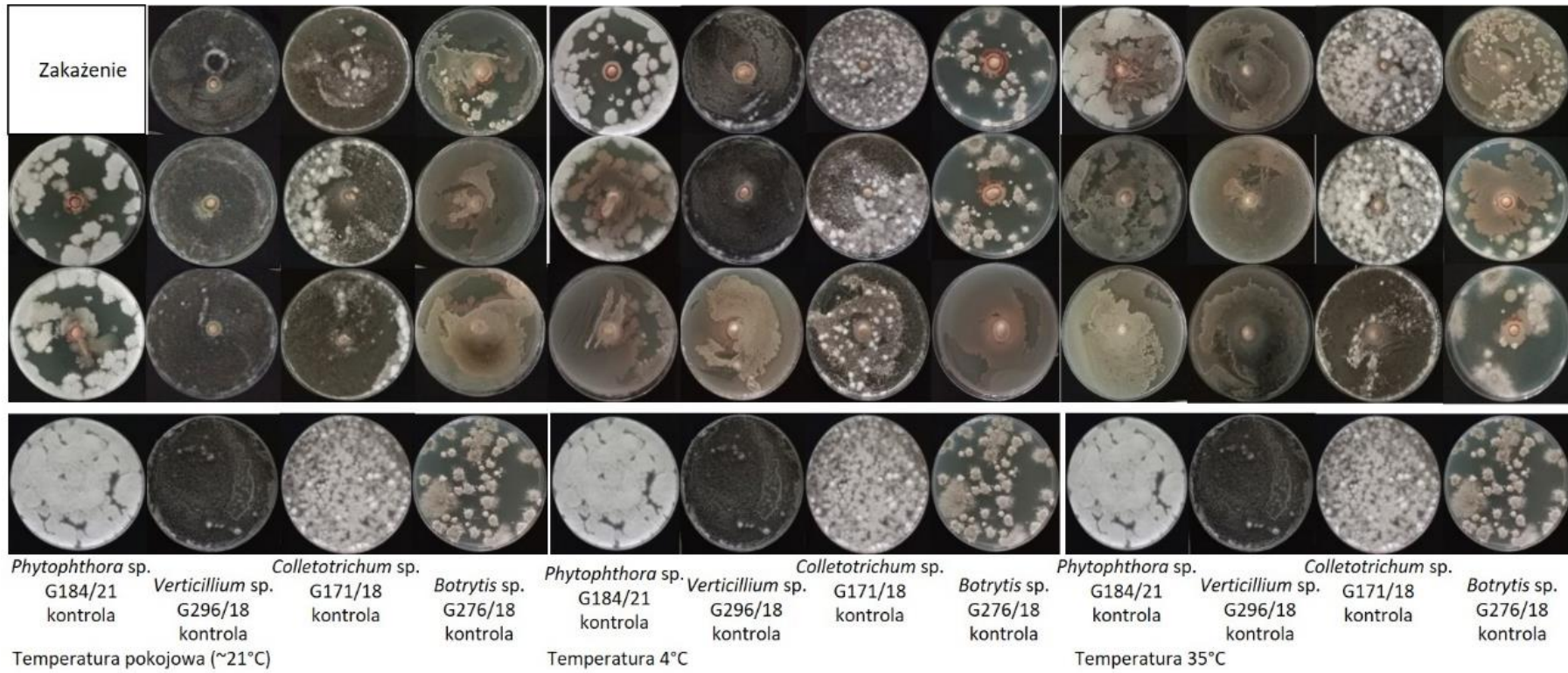
**Fig. 8**

<b>Fitopatogeny</b>	<b>Strefa zahamowania wzrostu (mm) <math>\pm</math>odchylenie standardowe – postać płynna</b>	<b>Strefa zahamowania wzrostu (mm) <math>\pm</math>odchylenie standardowe – postać sucha nierozpuszczalna w wodzie</b>	<b>Strefa zahamowania wzrostu (mm) <math>\pm</math>odchylenie standardowe – postać sucha rozpuszczalna w wodzie</b>
<b><i>Colletotrichum</i> sp. G171/18</b>	15,50 $\pm$ 13,67	13,30 $\pm$ 1,50	21,30 $\pm$ 40
<b><i>Botrytis</i> sp. G277/18 / G276/18</b>	22,70 $\pm$ 7,51	52,00 $\pm$ 33,00	27,00 $\pm$ 2,60
<b><i>Phytophthora</i> sp. G408/18 / G184/21</b>	11,00 $\pm$ 1,41	50,70 $\pm$ 23,60	78,30 $\pm$ 10,40
<b><i>Verticillium</i> sp. G297/18 / G296/18</b>	19,90 $\pm$ 8,4	43,00 $\pm$ 41,00	46,00 $\pm$ 7,90

**Fig. 9**

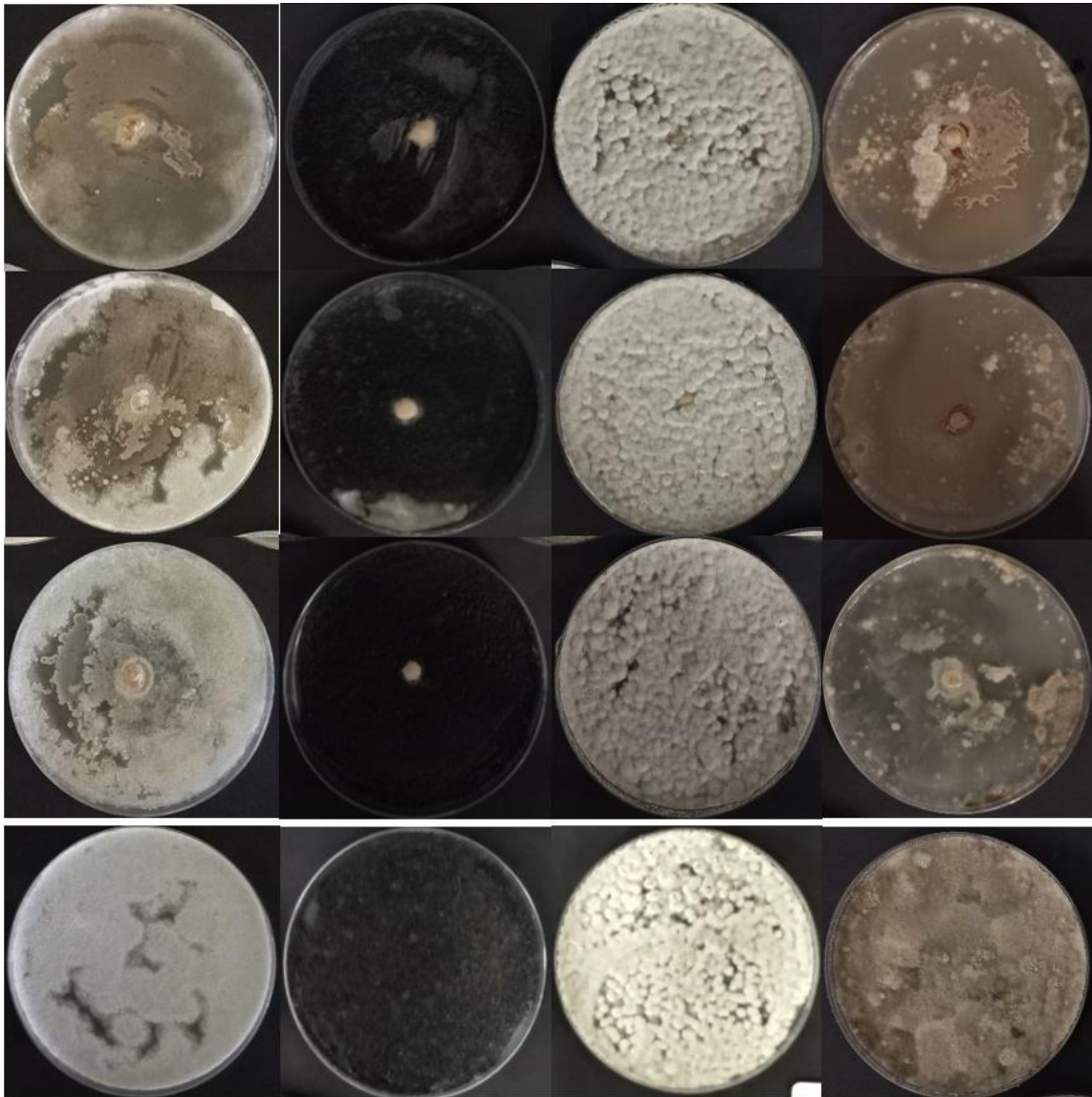


**Fig. 10**



**Fig. 11**





*Phytophthora* sp.  
G184/21  
kontrola

*Verticillium* sp.  
G296/18  
kontrola

*Colletotrichum* sp.  
G171/18  
kontrola

*Botrytis* sp.  
G276/18  
kontrola

**Fig. 12**

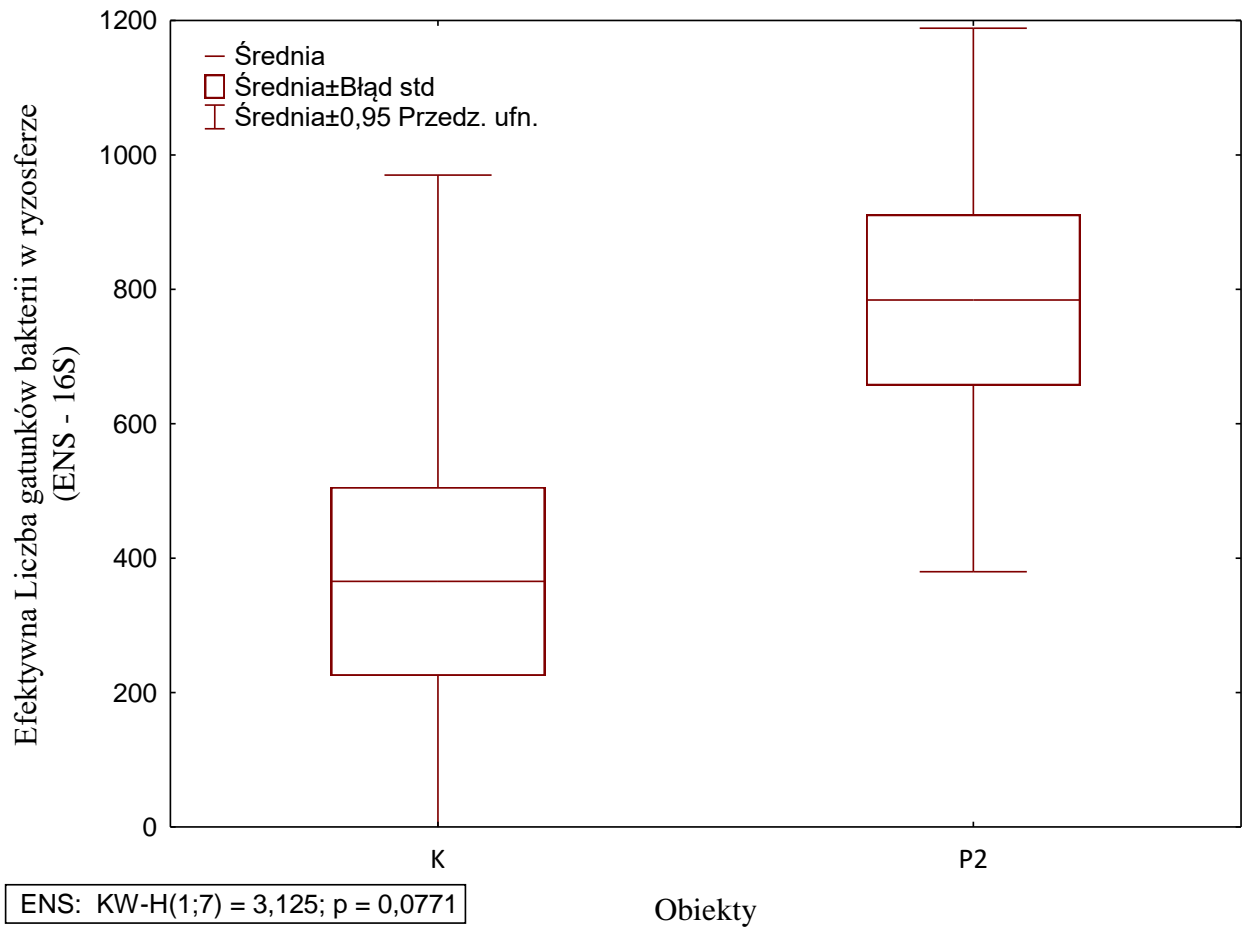
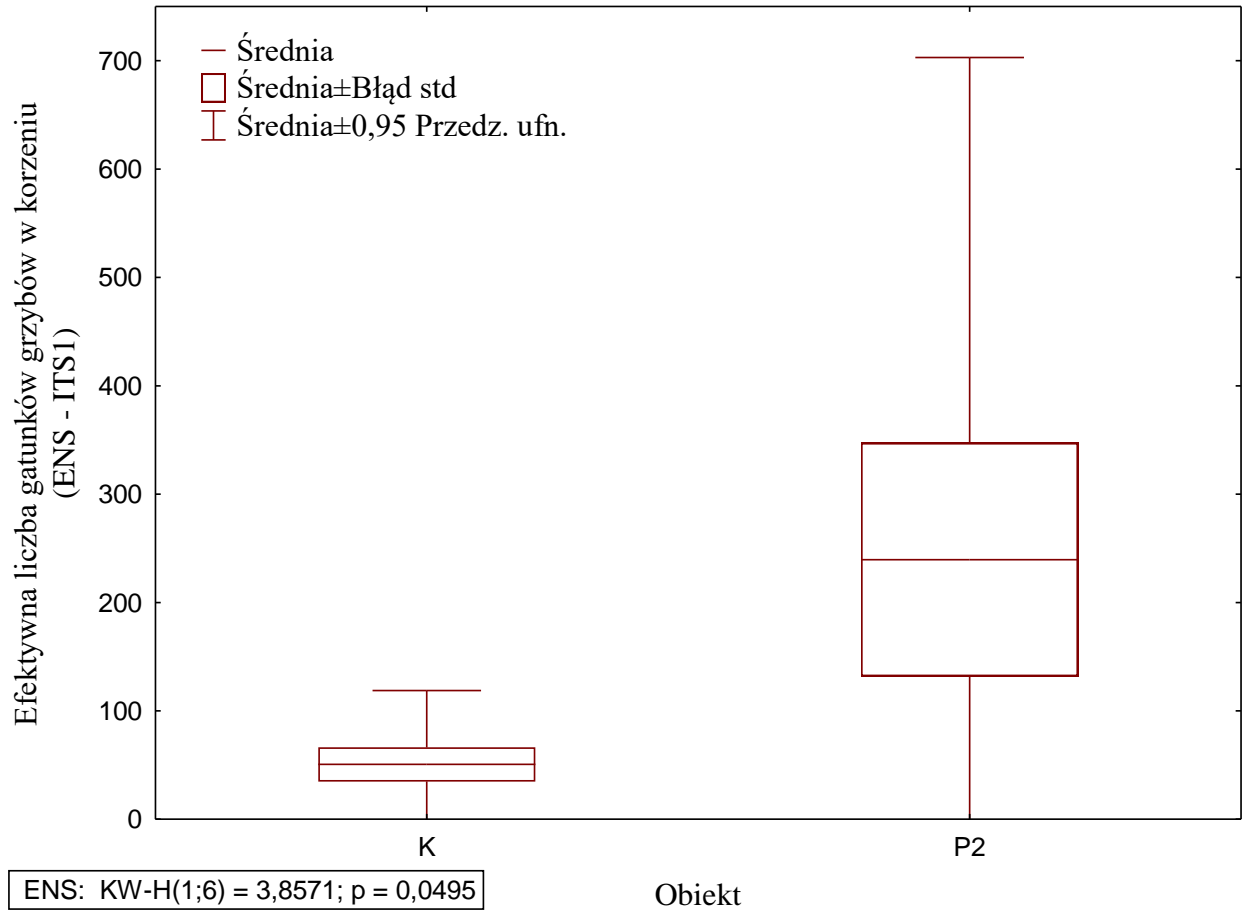


Fig. 13

**Fig.14**

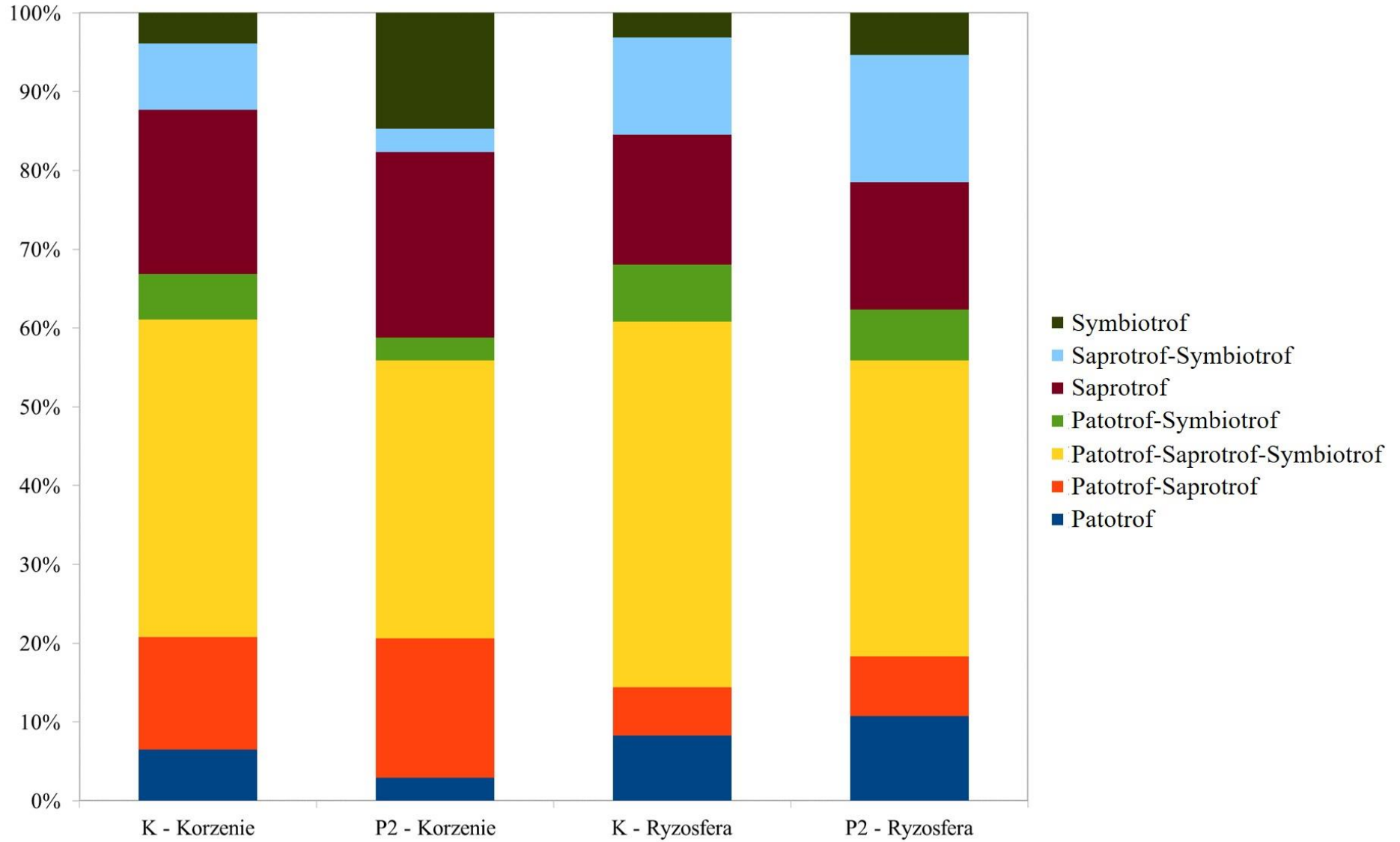


Fig. 15

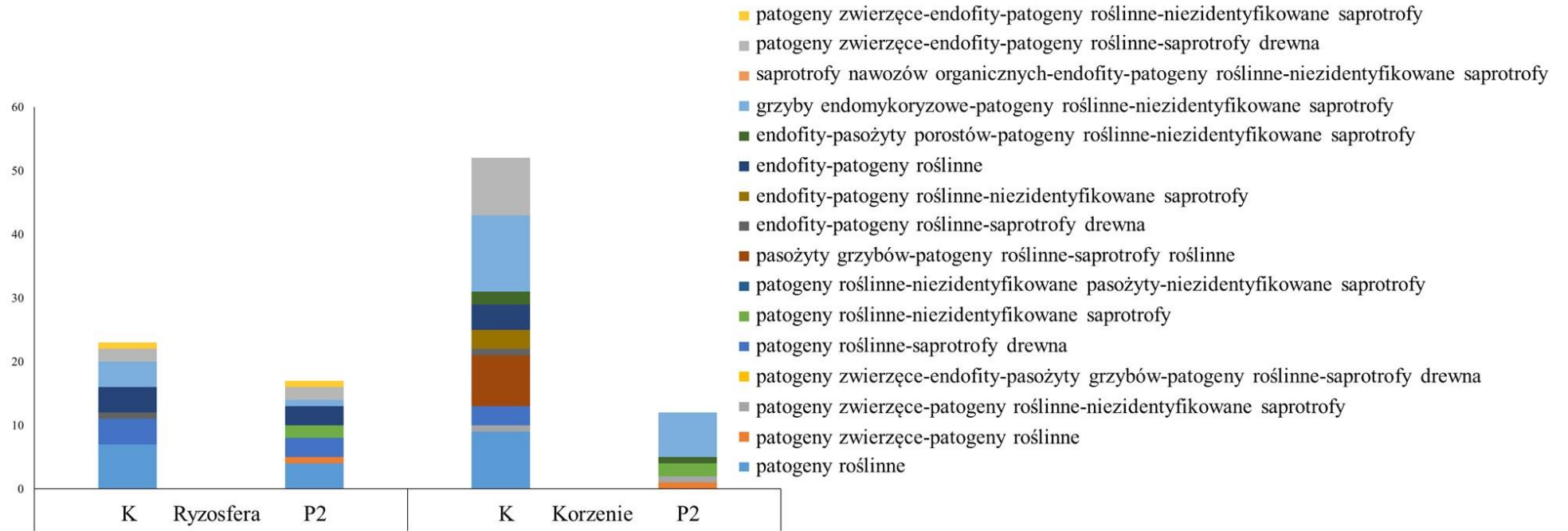


Fig. 16

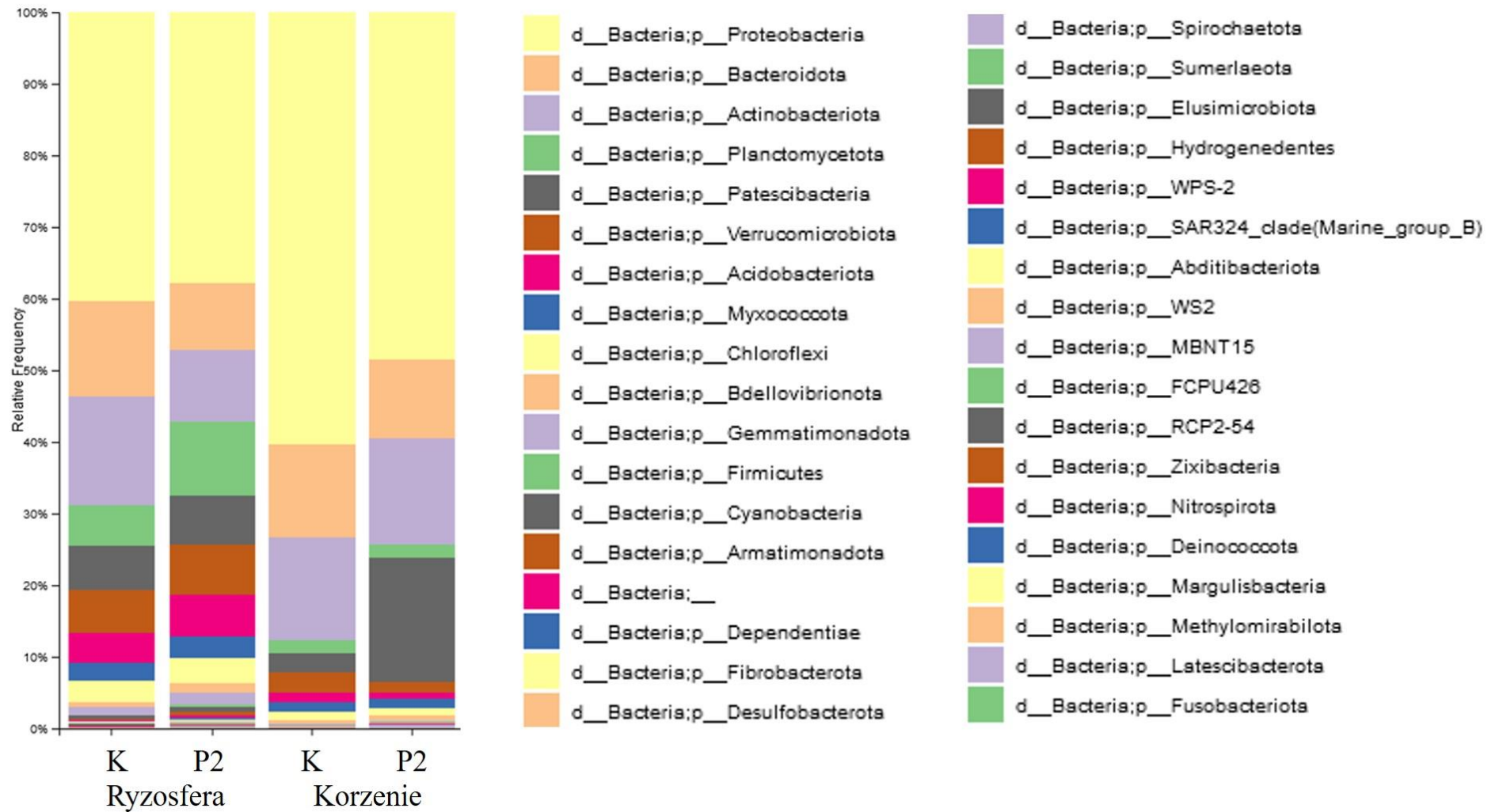


Fig. 17

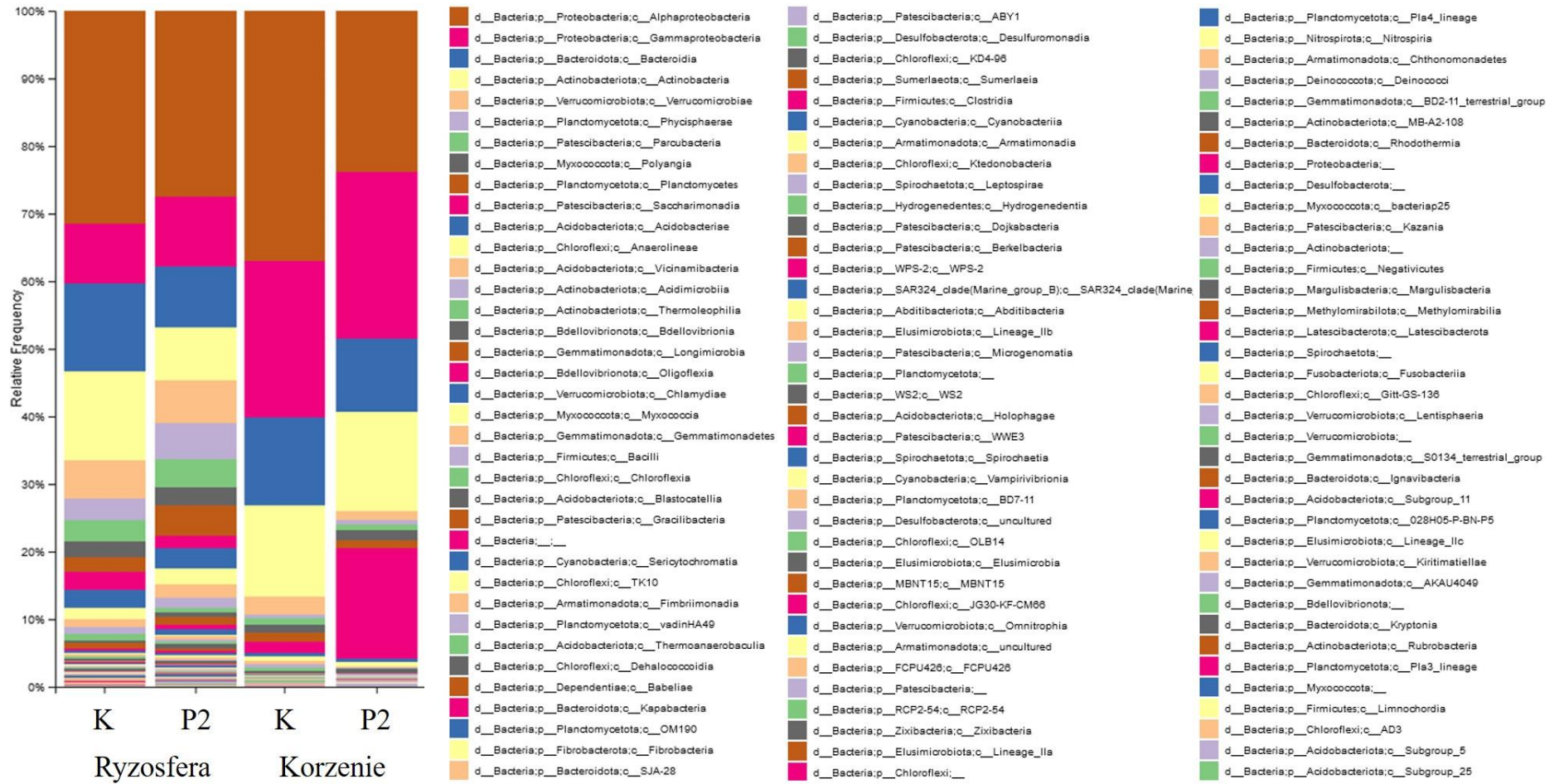


Fig. 18

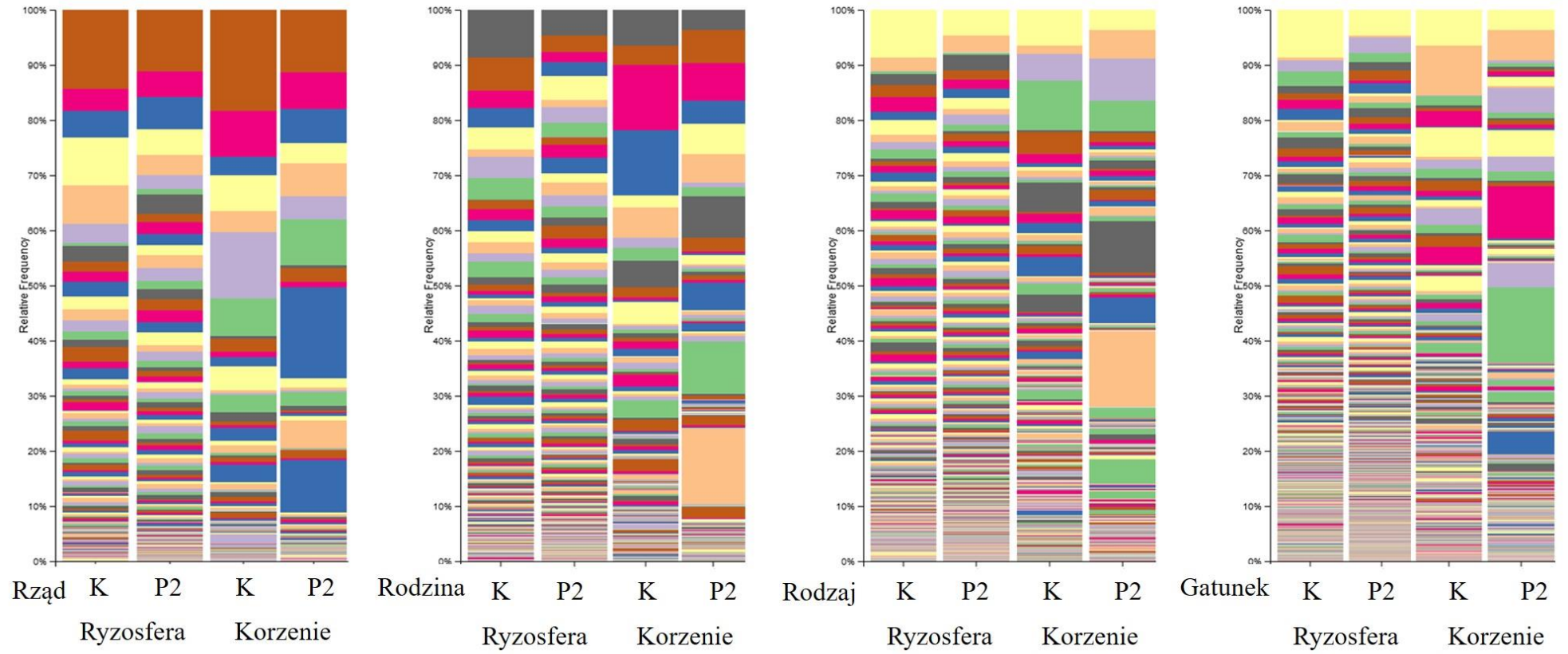
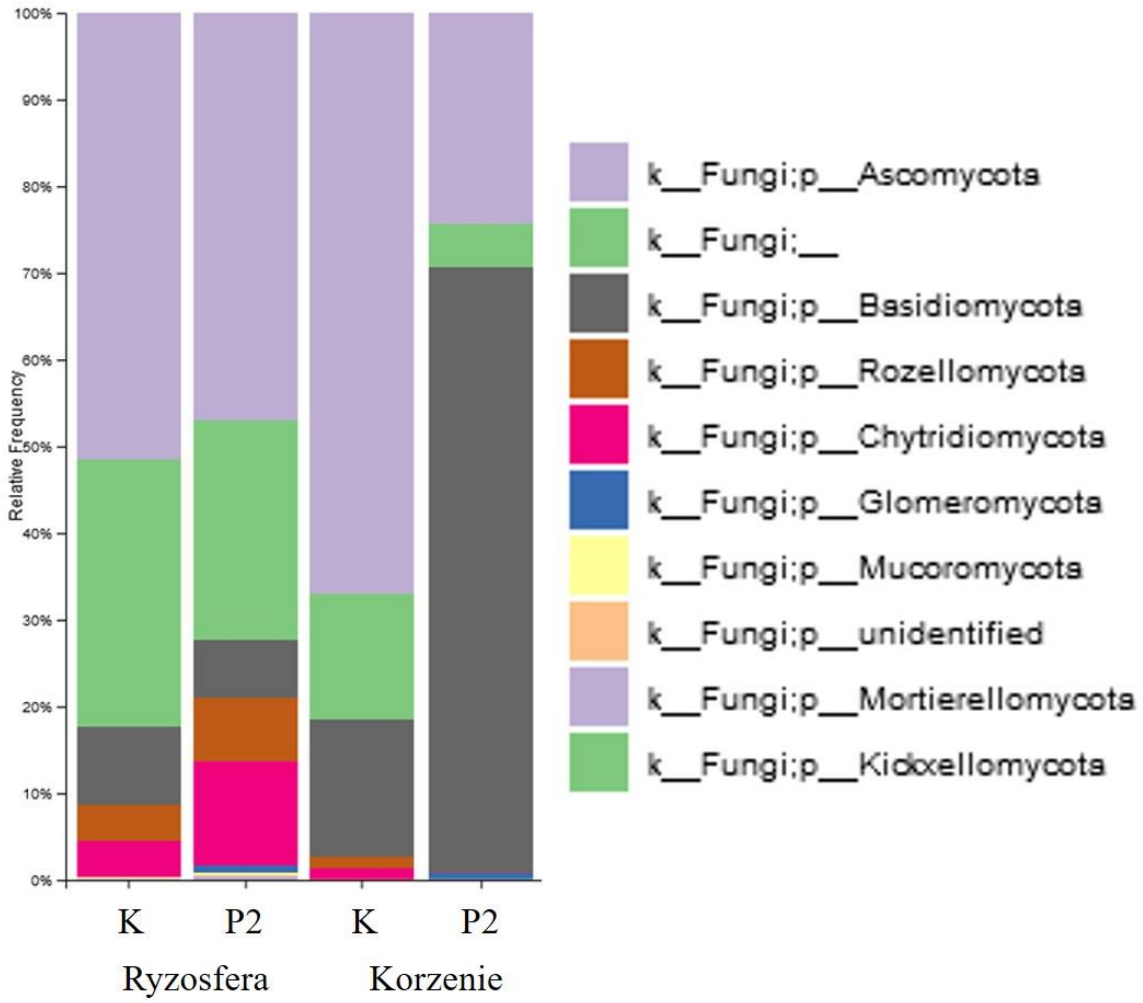


Fig. 19





**Fig.20**

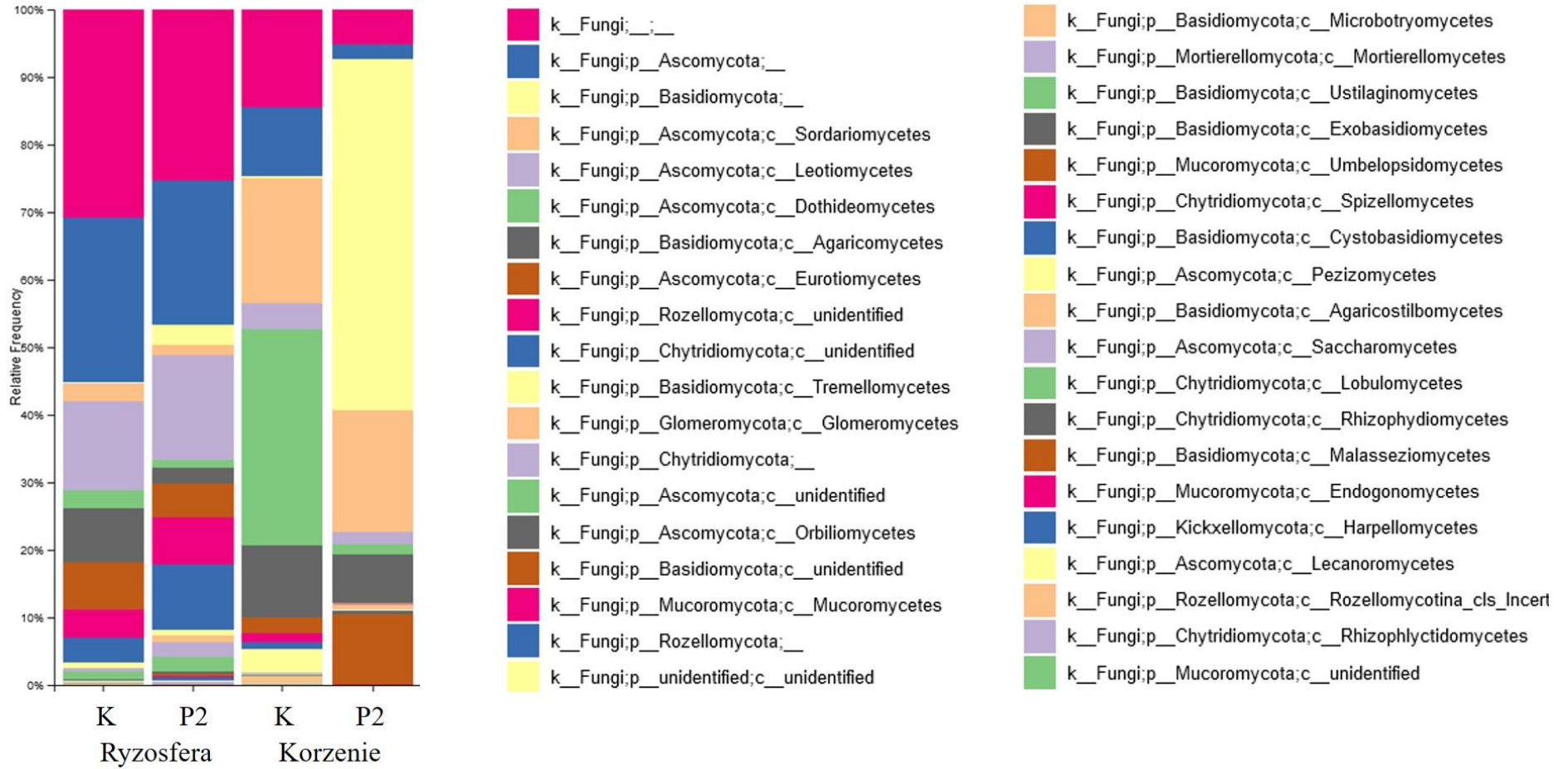


Fig. 21

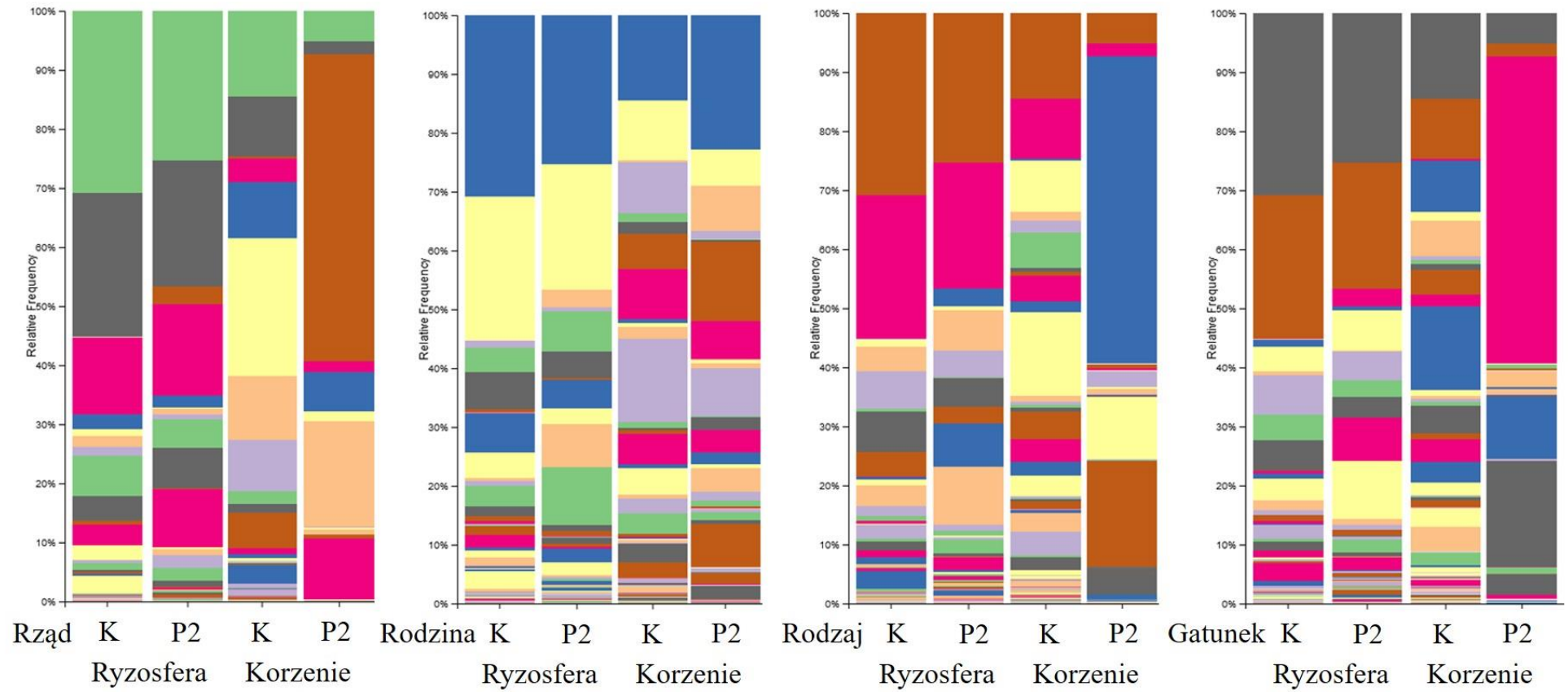


Fig.22

## SKRÓT OPISU

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby pozwalającego jednocześnie na kontrolę fitopatogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazującego cechy biostymulacyjnego działania na rośliny, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, **w którym** stosuje się: dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp116AC\* – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, zawieszane w podłożu hodowlanym albo suszone na nośniku albo liofilizowane na nośniku; nośnik właściwy w postaci podłoża hodowlanego dla postaci płynnej albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie oraz dodatek płynnych kwasów humusowych i odcieku po produkcji drożdży dla postaci płynnej albo suchych kwasów humusowych dla postaci suchej jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego. Przedmiotem wynalazku jest ponadto nawozowy produkt mikrobiologiczny do utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców, wykazujący cechy biostymulacyjnego działania na rośliny.

(25 zastrzeżeń)