



Sposób otrzymywania bakteryjnego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o działaniu biostymulacyjnym dla roślin, poprawiającym jakość gleby, w tym transformacje materii organicznej, przy jednoczesnych właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora* oraz biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania ekologicznego bakteryjnego biopreparatu – kompleksu do naturalizacji ryzosfery roślin malin, gdzie składnikiem aktywnym są wyselekcjonowane izolaty środowiskowe bakterii z rodzajów *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. i *Rhodococcus* sp., pochodzących z naturalnych siedlisk malin dzikorosnących z obszaru Polski oraz biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin. Przedmiot wynalazku obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów bakterii z rodzajów *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus* do zastosowania w biopreparacie oraz kompozycję podłoża namnażającego dla tych bakterii.

Grzybowe patogeny owoców miękkich są poważnym zagrożeniem dla współczesnego rolnictwa ekologicznego. Do patogenów, które powodują największe straty w rolnictwie można zaliczyć między innymi mikroorganizmy z rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Phytophthora* i *Verticillium*. Patogeny grzybowe w rolnictwie konwencjonalnym, w którym powszechnie stosowane są środki ochrony roślin, powodują nawet 18% strat w plonach (OERKE, E. 2006. *Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43). Ze względu na rozporządzenie Rady Europejskiej

(WE) nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 roku rolnicy, którzy prowadzą uprawy w sposób ekologiczny zmuszeni są do ograniczenia stosowania konwencjonalnych preparatów ochrony roślin. Ponadto, zgodnie z założeniami dokumentów strategicznych Europejski Zielony Ład (*European Green Deal, 2020, https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_pl*) oraz Strategii na rzecz Bioróżnorodności do 2030 roku (*EU Biodiversity Strategy for 2030, https://ec.europa.eu/environment/nature/biodiversity/strategy/index_en.htm*) planowane jest zwiększenie powierzchni upraw ekologicznych, zmniejszenie zużycia pestycydów oraz nawozów mineralnych, co sprawia, że poszukiwanie rozwiązań alternatywnych i opracowywanie biopreparatów opartych o naturalne mikroorganizmy jest w pełni uzasadnione i wychodzi naprzeciw potrzebom konsumentów. W/w regulacje sugerują stosowanie w zamian środków pochodzenia naturalnego takich jak biopreparaty, biostymulatory czy bioprodukty. Środki te, a zwłaszcza bioprodukty mikrobiologiczne, pozytywnie wpływają na zdrowie rośliny, jej wzrost i plon, a także zwiększają odporność roślin na biotyczne lub abiotyczne stropy środowiskowe (*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 18, 597–616*). Dodatkowo, obserwowane zagrożenia dla utrzymania dobrej jakości środowiska glebowego m.in. związane z glebową materią organiczną (*Bolinder M.A., Crotty F., Annemi E., Frac M., Kismányoky T., Lipiec J., Tits M., Tóth Z., Kätterer T., 2020, The effect of crop residues, cover crops, manures and nitrogen fertilization on soil organic carbon changes in agroecosystems: a synthesis of reviews. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change <https://doi.org/10.1007/s11027-020-09916-3>*), które wpływają jednocześnie na jakość plonowania, wymagają opracowania rozwiązań, które przyczynią się do poprawy jakości środowiska glebowego. Ponadto, w związku z tym, że konsumenci coraz częściej sięgają po produkty ekologiczne, jako zdrowsze i charakteryzujące się lepszą wartością odżywczą, oraz mające mniejsze negatywne oddziaływanie na środowisko naturalne (*Duncan Hunter, Meika Foster, Jennifer O. McArthur, Rachel Ojha, Peter Petocz & Samir Samman, 2011. Evaluation of the Micronutrient Composition of Plant Foods Produced by Organic and Conventional Agricultural Methods, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51:6, 571-582*), istnieje potrzeba poszukiwania i opracowywania nowych biopreparatów, które mogłyby znaleźć praktyczne zastosowanie w rolnictwie.

Biopreparaty to produkty wytworzone z żywych organizmów lub ich metabolitów. Obecnie na rynku są dostępne biopreparaty bazujące na inokulum mikrobiologicznym takie jak np. *Micosat F* czy *Polyversum WP* oparte odpowiednio na grzybach *Trichoderma* spp. i *Pythium oligandrum*. Przykładowo te biopreparaty pozwalają na hamowanie wzrostu patogenów owoców miękkich należących do rodzaju *Botrytis*. Dostępne są też inne biopreparaty pozwalające na kontrolę grzybów z rodzaju *Phytophthora* – *PREV-AM*, *Colletotrichum* – *Chitosan*, *Verticillium* – *Bioczos S* (Živković, Svetlana & Stevanovic, Milos & Djurovic, Sanja & Ristić, Danijela & Stošić, Stefan, 2018. *Antifungal activity of chitosan against Alternaria alternata and Colletotrichum gloeosporioides*. *Pesticidi i fitomedicina*. 33. 197-204., Marjańska-Cichoń, Barbara & Sapięha-Waszkiewicz, Anna & Prusa, B. 2009. *Effectiveness of Biofungicides Bioczos S and Polyversum Used to Soak Strawberry Cuttings in Verticillium Wilt Disease Control*. *Journal of Plant Protection Research*. 49). Jednakże, ważnym czynnikiem w skuteczności biopreparatu opartego o inokulum mikrobiologiczne jest to, aby mikroorganizmy pochodziły z podobnej strefy klimatycznej lub nawet z roślin należących do tego samego rodzaju/gatunku na jakim docelowy biopreparat będzie stosowany. Zwiększa to szansę na dłuższe przeżycie mikroorganizmów w miejscu zastosowania i wydłużenie skuteczności zabiegu, gdyż rodzime szczepy mikroorganizmów są lepiej przystosowane do lokalnych warunków środowiskowych i lepiej radzą sobie z ograniczaniem porażenia roślin przez grzyby fitopatogeniczne występujące w danym regionie geograficznym (Ibrahim Fikri, Ahmad & Abdul Rahman, Irman & Md nor, Norefrina & Hamzah, Aion., 2018. *Isolation and identification of local bacteria endophyte and screening of its antimicrobial property against pathogenic bacteria and fungi*. *AIP Conference Proceedings*. 1940). Sprawia to, że istnieje potrzeba opracowania nowych biopreparatów opartych o rodzime wyselekcjonowane mikroorganizmy, które będą wykazywały działanie biostymulacyjne dla roślin, poprawiające jakość gleby, w tym transformacje materii organicznej oraz będą charakteryzowały się właściwościami antagonistycznymi wobec roślinnych patogenów grzybowych.

Najczęściej patenty dotyczą biopreparatów wykorzystywanych do biokontroli pojedynczych grzybów fitopatogenicznych np. z rodzaju *Alternaria* czy *B. cinerea* (Sas-Paszt L., Trzciniński P., Lisek A., 2016, *Biopreparat bakteryjny ograniczający występowanie chorób przechowalniczych warzyw oraz jego kompozycja*, Pat.232029). Stosowanie różnych szczepów bakterii np. z rodzaju *Bacillus* w bioproduktach, biostymulatorach wzrostu roślin czy biopreparatach ochrony roślin jest znane i szeroko opisane. Z kolei z opisu patentowego

Pat.228631 znane są kompozycje roślinnych substancji biologicznie aktywnych w celu ograniczenia działalności i wzrostu roślinnych patogenów grzybowych (*Grzywa-Niksińska I., Legocka I., Machałowska M., Kowiecznikow A., 2014, Biopreparat na podłożu stałym do pielęgnacji roślin oraz sposób wytwarzania biopreparatu, Pat.228631*). W literaturze przedmiotu do opracowania biopreparatów wykorzystywane są różne nośniki dla mikroorganizmów, które często są jednocześnie podłożem hodowlanym. Opis patentowy *Pat.232023* przedstawia preparat bakteryjny do ochrony liści roślin ogrodniczych przed grzybowymi fitopatogenami, w skład którego wchodzi szczepy bakterii *Mitsuaria chitosanitabida* CH78Ai, *Bacillus* sp. Sp2M, *Bacillus* sp. Sp3F oraz *Serratia plymuthica* AF65AL (*Sas-Paszt L., Trzciniński P., Lisek A., 2016, Biopreparat bakteryjny do ochrony liści roślin ogrodniczych przed fitopatogenami pochodzenia grzybicznego oraz jego kompozycja, Pat.232023*). Preparaty te nie zawierają jednak w swej kompozycji szczepów innych bakterii obecnych w przedmiotowym wynalazku. Jednocześnie, brak jest rozwiązań opartych o zastosowanie kilku będących przedmiotem niniejszego wynalazku, różnych szczepów bakterii z rodzajów *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, które poprawiają udostępnianie roślinom składników pokarmowych oraz jakość gleby i roślin poprzez syntezę enzymów oraz kontrolę fitopatogenów należących do rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Phytophthora* i *Verticillium*, poprzez zdolności antagonistyczne zastosowanych saprofitycznych szczepów bakterii wyizolowanych z ryzosfery dzikorosnących malin oraz dodatków poprawiających ich konkurencyjność pokarmową względem fitopatogenów.

Najczęściej patenty dotyczą biopreparatów wykorzystywanych do kontroli patogenów roślin warzywnych lub uprawnych, a brak jest rozwiązań, obejmujących działanie biostymulacyjne dla roślin, poprawę jakości gleby, w tym transformację materii organicznej przy jednoczesnym antagonistycznym oddziaływaniu na kluczowe patogeny grzybowe, przeznaczonych do stosowania w ekologicznej uprawie malin, lub są to rozwiązania obejmujące kontrolę pojedynczych patogenów np. z rodzaju *Botrytis*, nie stanowiąc kompleksowego rozwiązania dla wszystkich czterech patogenów grzybowych (*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium* spp.), biostymulacji wzrostu roślin i poprawy jakości gleby.

Brak jest też doniesień literaturowych i patentów odnośnie suplementacji biopreparatów dodatkami należącymi do związków z grupy kwasów organicznych, w celu

poprawy konkurencyjności pokarmowej saprofitycznych izolatów bakterii pochodzących z ryzosfery malin, względem patogenów roślin malin.

Celem wynalazku było opracowanie biopreparatu do naturalizacji ryzosfery malin, zawierającego takie szczepy bakterii z rodzaju *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, które nie działają na siebie antagonistycznie, a które posiadają właściwości transformacji materii organicznej oraz biostymulacji roślin, a także wykazują aktywność antagonistyczną w stosunku do patogenów grzybowych *Botrytis* spp., *Verticillium* spp. *Colletotrichum* spp. i *Phytophthora* spp., oraz poprawiającego konkurencyjność pokarmową szczepów bakteryjnych wchodzących w skład preparatu, w stosunku do roślinnych patogenów grzybowych dzięki dodatkowi odpowiedniej prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej.

Cel ten osiągnięto poprzez opracowanie sposobu otrzymywania bakteryjnego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin, kompozycji biopreparatu oraz istotnych do wytworzenia biopreparatu: sposobu prowadzenia hodowli szczepów bakterii *Arthrobacter* sp. B58/18 i B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18 i *Rhodococcus* sp. B12/18 do zastosowania w biopreparacie, kompozycji podłoża namnażającego dla tych bakterii oraz warunków ich suszenia na odpowiednim nośniku, a także dodatku prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej. Dzięki przeprowadzonym badaniom uzyskano unikalny, zoptymalizowany skład podłoża hodowlanego, nośników i innych suplementów, które decydują zarówno o właściwościach, jak też o oryginalności opracowanego biopreparatu, stanowiąc jednocześnie zastrzeżenia patentowe.

Istotą sposobu otrzymywania bakteryjnego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin, biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin, o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzajów *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, **jest to**, że stosuje się:

- 4 wyselekcjonowane z ryzosfery malin dzikorosnących, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, sekwencje wskazane na liście sekwencji, hodowane na mineralnym podłożu namnażającym z mikroelementami i dodatkiem źródła

węgla i azotu, przygotowanym na wodzie albo na supernatancie ziemi okrzemkowej, stanowiącej odpad po filtracji piwa, suszone na nośniku;

- dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: kwasu jabłkowego, kwasu α -ketoglutarynowego, kwasu γ -aminomasłowego, N-acetylo D-glukozyaminy albo ich dowolną mieszaninę.

Korzystnie, sposób obejmuje metodę prowadzenia hodowli szczepów bakterii *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18 i *Rhodococcus* sp. B12/18 o sekwencjach odpowiednio 1-4, wskazanych na liście sekwencji. Metoda polega na hodowli wskazanych szczepów bakterii na podłożu namnażającym ze źródłem węgla i azotu, związkami mineralnymi, suszeniu na nośniku oraz suplementacji dodatkami wspomagającymi konkurencyjność pokarmową szczepów stanowiących kompozycję biopreparatu. Szczepy bakterii namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu glukozowo-ziemniaczanym, w temperaturze 25-30°C, przez 24-48 godzin, a następnie tak przygotowanym inokulum zaszczenia się mineralne podłoże namnażające i prowadzi się hodowlę wytrząsaną w warunkach tlenowych, w temperaturze 25-30°C, w czasie 72-96 godzin, korzystnie 72 godzin przy 120 rpm. Stosowane podłoże namnażające zapewnia wzrost każdego ze szczepów, przy czym hodowle prowadzone są osobno dla każdego szczepu, a uzyskane hodowle następnie miesza się. Dla zaszczenia podłoża namnażającego, wprowadza się korzystnie 10% objętości hodowli zawierającej 10^8 - 10^9 jtk ml⁻¹ lub odpowiednio 1% objętości hodowli zawierającej 10^{10} jtk ml⁻¹.

Korzystnie, mineralne podłoże namnażające zawiera w 1 litrze jako źródło węgla: sacharozę w ilości 30 g \pm 10% i trehalozę w ilości 34 g \pm 10%, a jako źródło azotu: NH₄NO₃ w ilości 6 g \pm 10%. Ponadto trehalozę stosuje się w celu zabezpieczenia komórek w procesie suszenia.

Korzystnie, mineralne podłoże namnażające zawiera mikroelementy: Mn, Zn, Cu, Co, Mo.

Korzystnie, po zakończeniu hodowli wysyca się ją dekstrozą, która stanowi 10% \pm 5% w stosunku do wagi uzyskanej hodowli, a następnie ziemią okrzemkową, korzystnie gruboziarnistą, w stosunku wagowym do kompozycji przeznaczonej do suszenia 1:2, stanowiącymi nośnik dla komórek bakterii.

Wariantowo, po zakończeniu hodowli wysyca się ją dekstrozą, która stanowi 10% \pm 5% w stosunku do wagi uzyskanej hodowli, a następnie, dla uzyskania rozpuszczalnej formułacji

suchej do oprysku bądź zraszania, jako nośnik bakterii stosuje się dekstrozę albo maltodekstrynę albo mieszaninę dekstrozy albo maltodekstryny z prebiotycznymi dodatkami suplementacyjnymi.

Korzystnie, hodowle wysycone nośnikami suszy się w warunkach obniżonego ciśnienia, wynoszącego 50 mbar w temperaturze 25° - 30°C do uzyskania około 93% suchej masy.

Korzystnie, do procesu suszenia wprowadza się środek pochłaniający wilgoć.

Korzystnie, stosuje się wysuszoną i zawieszoną na nośnikach biomasę każdego ze szczepów *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18 i *Rhodococcus* sp. B12/18, o sekwencjach odpowiednio 1-4, wskazanych na liście sekwencji, zmieszaną w równym stosunku wagowym.

Korzystnie, stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej w równym stosunku wagowym kwas jabłkowy, kwas α -ketoglutarynowy, kwas γ -aminomasłowy, N-acetylo D-glukozaaminę.

Korzystnie, stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu w ilości 0,1-2%, najkorzystniej 1% końcowej masy biopreparatu.

Istota bakteryjnego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin, biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin, przyspieszającego rozkład materii organicznej, o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzajów *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, polega na tym, że zawiera 4 wyselekcjonowane z ryzosfery malin dzikorosnących, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, sekwencje wskazane na liście sekwencji, hodowane na mineralnym podłożu z mikroelementami i dodatkiem źródła węgla i azotu, przygotowanym na wodzie albo na supernatancie ziemi okrzemkowej, stanowiącej odpad po filtracji piwa, suszone na nośniku, oraz dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: kwasu jabłkowego, kwasu α -ketoglutarynowego, kwasu γ -aminomasłowego, N-acetylo D-glukozaaminy albo ich dowolną mieszaninę.

Korzystnie, szczepy bakteryjne *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18 i *Rhodococcus* sp. B12/18, o sekwencjach odpowiednio 1-4, wskazanych na liście sekwencji, występują w równym stosunku wagowym.

Korzystnie, dodatek mieszanki suplementacyjnej zawiera w równym stosunku wagowym: kwas jabłkowy, kwas α -ketoglutarynowy, kwas γ -aminomasłowy, N-acetylo D-glukozaaminę.

Korzystnie, dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu wynosi 0,1-2%, najkorzystniej 1% końcowej masy biopreparatu.

Korzystnie, bakteryjny biopreparat ma postać suchą nierozpuszczalną w wodzie. Jako nośnik bakterii zawiera wówczas korzystnie ziemię okrzemkową, najkorzystniej gruboziarnistą.

Wariantowo bakteryjny biopreparat ma postać suchą rozpuszczalną w wodzie. Jako nośnik bakterii, zawiera wówczas korzystnie dekstrozę albo maltodekstrynę albo mieszaninę dekstrozy albo maltodekstryny z prebiotycznymi dodatkami suplementacyjnymi.

Otrzymany biopreparat umożliwia kontrolę czterech kluczowych grzybowych patogenów malin z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Verticillium*. Biopreparat aplikuje się na i/lub pod korzenie roślin, stosuje się podlewanie naturalizacyjne i/lub opryskuje bądź zrasza.

W korzystnym sposobie naturalizacji ryzosfery malin lub biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin lub zwalczania patogenów roślin biopreparat stosuje się w ilości 25-50 kg/ha doglebowo przy zakładaniu plantacji, 0,5-1 kg/ha do zawieszenia w wodzie wprowadzając go bezpośrednio na i/lub pod korzenie roślin przy zakładaniu nowych plantacji, lub/i w celu podlewania naturalizacyjnego pod roślinę i/lub opryskiwania/zraszania w przypadku istniejących plantacji, preparatu zawierającego co najmniej 10^6 /ml lub 10^6 /g, korzystnie co najmniej 10^7 /ml lub 10^7 /g, korzystniej 10^8 /ml lub 10^8 /g komórek saprofitycznych bakterii wyizolowanych z ryzosfery malin według kompozycji i/lub biopreparatu, przy czym w postaci podlewania naturalizacyjnego i/lub oprysku/zraszania/irygacji biopreparat można korzystnie rozcieńczyć wodą w zależności od potrzeb.

Przedmiotowe rozwiązanie stanowi naturalną metodę biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin ze względu na właściwości wyselekcjonowanych szczepów bakterii: *Arthrobacter* sp.

B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, które potrafią degradować materię organiczną do łatwo przyswajalnych związków przez rośliny będących źródłem m.in. azotu czy fosforu. Szczepy wchodzące w skład kompozycji posiadają właściwości do rozkładu skrobi (amylolityczne), celulozy (celulolityczne) oraz białek (proteolityczne), a także amonifikacyjne i denitryfikacyjne, oraz charakteryzują się aktywnością enzymatyczną, co sprawia, że kompozycja biopreparatu wpływa na przemiany zachodzące w środowisku glebowym, biostymulując jednocześnie wzrost i rozwój roślin. Szczepy wybrane do kompozycji posiadają dodatkowo właściwości antagonistyczne w stosunku do fitopatogennych grzybów powodujących choroby roślin maliny, w tym z rodzaju *Bortyis*, *Colletotrichum*, *Phytophthora* i *Verticillium*.

Wynalazek został uwidoczniiony w przykładach wykonania na rysunkach, gdzie:

Fig. 1 przedstawia kultury bakterii wchodzących w skład kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich na płytkach Petriego z pożywką PDA oraz w zoptymalizowanym podłożu płynnym

Fig. 2 przedstawia profil metaboliczny szczepów bakterii będących składnikami biopreparatu, 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 biopreparatu, na substratach należących do aminokwasów, alkoholi cukrowych, węglowodanów, kwasów cukrowych, pochodnych cukrowych oraz kwasów karboksylowych

Fig. 4 przedstawia wrażliwość chemiczną szczepów bakterii będących składnikami biopreparatu, 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 biopreparatu, na podstawie zahamowania intensywności wzrostu (A 750 nm)

Fig. 6 przedstawia brak wzajemnego antagonistycznego oddziaływania szczepów bakteryjnych wchodzących w skład kompozycji stanowiącej kompleks do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich, a – *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4; b –

Pseudomonas sp. B37/18 - sekwencja nr 3; c – *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1; d – *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2

Fig. 7 przedstawia przykładowe profile aktywności enzymatycznej szczepów będących składnikami kompleksu bakteryjnego do naturalizacji ryzosfery malin, określone na podstawie testów API ZYM (Biomérieux)

Fig. 8 przedstawia antagonizm szczepu *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1 wobec grzybów fitopatogenicznych z rodzaju *Botrytis* (a), *Colletotrichum* (b) i *Verticillium* (c)

Fig. 9 przedstawia antagonizm szczepu *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2 wobec grzybów fitopatogenicznych z rodzaju *Botrytis* (a), *Colletotrichum* (b) i *Verticillium* (c)

Fig. 10 przedstawia antagonizm szczepu *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3 wobec grzybów fitopatogenicznych z rodzaju *Botrytis* (a), *Colletotrichum* (b) i *Verticillium* (c)

Fig. 11 przedstawia antagonizm szczepu *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4 wobec grzybów fitopatogenicznych z rodzaju *Botrytis* (a), *Colletotrichum* (b) i *Verticillium* (c)

Fig. 12 przedstawia biostymulacyjne działanie biopreparatu na rośliny malin w doświadczeniu fitotronowym: a) wariant bez naturalizacji, b) naturalizacja korzeni podczas sadzenia, c) naturalizacja korzeni podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne, d) podlewanie naturalizacyjne

Fig. 13 przedstawia biostymulacyjne działanie biopreparatu na rośliny malin w doświadczeniu fitotronowym w warunkach stresu biotycznego wywołanego kontaminacją *Verticillium* sp. (G296/18): a) wariant bez naturalizacji, b) naturalizacja korzeni podczas sadzenia, c) naturalizacja korzeni podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne, d) podlewanie naturalizacyjne

Fig. 14 przedstawia biostymulacyjne działanie biopreparatu na rośliny malin w doświadczeniu fitotronowym w warunkach stresu biotycznego spowodowanego kontaminacją patogenów *Botrytis* sp. (G277/18), *Colletotrichum* sp. (G172/18), *Phytophthora* sp. (G408/18), *Verticillium* sp. (G296/18): a) wariant bez naturalizacji, b) naturalizacja korzeni podczas sadzenia, c) naturalizacja korzeni podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne, d) podlewanie naturalizacyjne

Fig. 15 przedstawia tabelę dotyczącą właściwości metabolicznych szczepów wchodzących w skład kompozycji do naturalizacji ryzosfery malin

Fig. 16 przedstawia tabelę dotyczącą oceny właściwości antagonistycznych na podstawie stref zahamowania wzrostu grzybów fitopatogenicznych przez bakterie wchodzące w skład kompozycji do naturalizacji ryzosfery malin

Fig. 17 przedstawia tabelę dotyczącą selekcji prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej stanowiącej dodatek do biopreparatu wspomagający konkurencyjność pokarmową szczepów bakterii wchodzących w skład biopreparatu na podstawie stosunku stopnia zużycia substratów do intensywności wzrostu na poszczególnych substratach dla bakterii wchodzących w skład biopreparatu oraz izolatów roślinnych patogenów grzybowych

PRZYKŁADY

Przykład 1. Wybór składu szczepów bakterii wchodzących w skład kompozycji biopreparatu, w tym identyfikacja oraz charakterystyka biochemiczna szczepów bakterii będących składnikami biopreparatu – kompleksu do naturalizacji ekologicznych upraw owoców miękkich

Wyizolowano 47 szczepów bakterii z ryzosfery dzikorosnących malin z terenu Polski, a następnie przeprowadzono ich identyfikację do rodzaju/gatunku z wykorzystaniem amplifikacji genu 16S rDNA, sekwencjonowania metodą Sanger'a i analiz bioinformatycznych polegających na porównaniu uzyskanych sekwencji nukleotydowych z bazami danych komercyjną MicroSeq[®] oraz ogólnie dostępną, otwartą bazą NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Z dostępnej puli szczepów wytypowano bakterie, które poddano dalszym badaniom laboratoryjnym, które wykazały ich potencjał antagonistyczny wobec kluczowych patogenów grzybowych malin z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i *Phytophthora*. Wyselekcjonowane szczepy bakteryjne tworzące kompozycję biopreparatu posiadają ponadto właściwości metaboliczne istotne dla funkcjonowania bioróżnorodności, właściwej mikrobioty gleby oraz prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, w tym charakteryzują się zdolnością udostępniania łatwo przyswajalnych związków mineralnych dla roślin, przeprowadzania procesu denitryfikacji i amonifikacji, oraz posiadają zdolności do rozkładu resztek roślinnych i zwierzęcych w wyniku procesu proteolizy, celulolizy i amylolizy, a także wykazują aktywność enzymów takich jak: fosfatazy, esterazy, aryamidazy, fosfohydrolaza, β -glukozydaza, β -galaktozydaza, mannozydaza, glukozaminidaza. Efektywna kompozycja wybranych bakterii, będąca przedmiotem niniejszego zgłoszenia patentowego, składa się z wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych, wykazujących działanie synergistyczne.

Ze względu na swoje uzupełniające się właściwości i synergistyczne współdziałanie wytypowano 4 szczepy bakteryjne wchodzące w skład kompozycji kompleksu do naturalizacji ekologicznych upraw owoców miękkich.

Szczepy bakteryjne *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, sekwencje przedstawione na liście sekwencji, wybrane do opracowania biopreparatu są izolatami środowiskowymi, wyselekcjonowanymi w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie i znajdują się w kolekcji tego Laboratorium. Zawarte w biopreparacie szczepy bakterii zostały wyselekcjonowane z ryzosfery dzikorosnących malin z obszaru Polski, stosując metodę seryjnych rozcieńczeń dziesiętnych, przy czym szczepy B12/18 - sekwencja nr 4 i B58/18 - sekwencja nr 1 wyodrębniono na podłożu z wyciągiem glebowym, a szczepy B37/18 - sekwencja nr 3 i B75/18 - sekwencja nr 2 na pożywce agarowej PCA (Plate Count Agar), prowadząc hodowle w temperaturze 26°C w ciągu 7 dni, a następnie wielokrotne pasażowanie izolatów na podłożu ziemniaczanym (PDA) w celu uzyskania czystych kultur bakterii.

Składające się na biopreparat szczepy bakterii B12/18 - sekwencja nr 4, B37/18 - sekwencja nr 3, B58/18 - sekwencja nr 1 i B75/18 - sekwencja nr 2, z charakterystycznym pomarańczowym (B12/18 - sekwencja nr 4), kremowym (B37/18 - sekwencja nr 3 i B58/18 - sekwencja nr 1) i żółtym (B75/18 - sekwencja nr 2) wzrostem obserwowanym na podłożu PDA oraz kremowym (B12/18 - sekwencja nr 4 i B37/18 - sekwencja nr 3) i czerwonym (B58/18 - sekwencja nr 1 i B75/18 - sekwencja nr 2) wzrostem w zoptymalizowanym podłożu płynnym (Fig.1), zidentyfikowano na podstawie analiz molekularnych obejmujących sekwencjonowanie fragmentu 16S rDNA odpowiednio do rodzajów: *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* i *Arthrobacter*, uzyskując sekwencje, przedstawione na Liście Sekwencji.

Wchodzące w skład preparatu szczepy bakterii (*Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1 i *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2) poddano szczegółowym analizom fizjologicznym i biochemicznym, określając zdolności do wykorzystania (utleniania) 71 różnych substratów węglowych, w tym aminokwasów, alkoholi cukrowych, węglowodanów, kwasów

cukrowych, pochodnych cukrowych oraz kwasów karboksylowych (Fig.2) oraz stopień wzrostu na tych substratach, mierzony przyrostem biomasy bakterii (Fig.3). Ponadto określono wrażliwość chemiczną wytypowanych szczepów bakteryjnych wobec wybranych 23 związków w tym antybiotyków i barwników. Profil odnoszący się do zahamowania procesów oddechowych bakterii wchodzących w skład biopreparatu przedstawia Fig.4, natomiast stopień zahamowania wzrostu bakterii przez badane związki został zaprezentowany na Fig.5.

Przykład 2. Określenie wzajemnego antagonistycznego oddziaływania szczepów bakteryjnych stanowiących kompozycję kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich

Aby określić, czy poszczególne szczepy nie wywierają na siebie wpływu o charakterze antagonistycznym, tj. hamującym wzrost jednych szczepów przez drugie, posiano na szalki Petriego z podłożem PDA wybrany szczep bakterii, a następnie na podłoże wyłożono jałowe krążki bibuły nasączonej hodowlą pozostałych szczepów bakterii w ustalonych konfiguracjach. Stworzone układy miały na celu sprawdzenie czy każdy ze szczepów jest w stanie rosnąć w bezpośrednim sąsiedztwie pozostałych szczepów. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 26°C przeprowadzono odczyty, na podstawie których stwierdzono, że pomiędzy badanymi mikroorganizmami wchodzącymi w skład kompozycji kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich nie zachodzi silne oddziaływanie o charakterze antagonistycznym, co oznacza, że badane szczepy nie zmieniają środowiska w taki sposób, który silnie hamowałby wzrost pozostałych szczepów. Wyniki zostały przedstawione na Fig.6.

Przykład 3. Określenie właściwości metabolicznych szczepów wchodzących w skład bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich

Badanie zdolności wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych do rozkładu biomasy lignino-celulozowej związane z wytwarzaniem enzymów celulolitycznych przeprowadzono na podłożu z wykorzystaniem fragmentów biomasy roślinnej – rozdrobionej słomy. Wynikiem dodatnim zdolności do biodegradacji biomasy lignino-celulozowej jest rozkład biomasy oraz obecność glukozy. Rozkład biomasy oceniano makroskopowo obserwując zmiany w wyglądzie zaszczipionej bakteriami biomasy, a aktywność celulolityczną oznaczono kolorymetrycznie na podstawie ilości uwolnionych

cukrów redukujących według standardowej metody przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dinitrosalicylowy (DNS) po 24 godzinach oraz po 7 dniach inkubacji w temperaturze 28-30°C. Wykazano, że szczepy wchodzące w skład biopreparatu *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4 potrafią degradować materię organiczną - Fig.15.

Właściwości amylolytyczne badano z wykorzystaniem podłoża stałego – agaru odżywczego z dodatkiem 1% skrobi. Do badania właściwości proteolitycznych zastosowano podłoża stałe – agar odżywczy z dodatkiem 4% odtłuszczonego mleka oraz agar odżywczy z dodatkiem 4% żelatyny. Na podłoża agarowe każdy ze szczepów bakteryjnych został wysiany poprzez zaszczepienie niewielką ilością komórek przenoszonych jałową eżą na środek płytki. Po 24-godzinnej oraz 7-dniowej inkubacji w temperaturze 30°C wykonano odczyty. Właściwości amylolytyczne określone na podstawie wyniku dodatniego, którym był brak fioletowego zabarwienia wokół wzrostu bakterii po zalaniu szalek płynem Lugola, wykazały szczepy *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3 i *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, wchodzące w skład kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich. Zdolność do rozkładu białka, przejawiająca się pojawieniem się strefy przejaśnienia wokół wzrostu bakterii lub po zalaniu odczynnikiem Fraziera w przypadku podłoża zawierającego żelatynę, wykazywały szczepy z rodzaju *Pseudomonas* i *Arthrobacter*, wchodzące w skład kompozycji biopreparatu: odpowiednio B37/18 - sekwencja nr 3 i B75/18 - sekwencja nr 2. Niewielkie zdolności do rozkładu żelatyny wykazywał również szczep *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1 (Fig.15).

Właściwości denitryfikacyjne oceniono z wykorzystaniem podłoża płynnego – bulionu odżywczego z dodatkiem 0,1% KNO₃. Podłoże zostało zaszczepione 1 ml inokulum przygotowanego na jałowej wodzie, po zoptymalizowaniu do transmitancji na poziomie 70%. O zdolności szczepu do denitryfikacji świadczy gromadzenie gazu w rurce Durhama oraz alkalizacja podłoża oznaczana za pomocą wskaźnika pH po 24 godzinach oraz po 7 dniach inkubacji w temperaturze 30°C. Zdolność do przeprowadzania procesu denitryfikacji (dysymilacyjnej redukcji azotanów) wykazały szczepy *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1 oraz *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2 wchodzące w skład biopreparatu. Właściwości amonifikacyjne, obejmujące proces przemiany azotu zawartego w związkach organicznych do amoniaku i jonów amonowych

przeprowadzono z wykorzystaniem podłoża płynnego z dodatkiem 4% mleka odtłuszczonego lub mocznika. Obecność amoniaku i jonów amonowych oznaczono po 24 godzinach oraz po 7 dniach inkubacji w temperaturze 28-30°C za pomocą odczynnika Nesslera, uznając za wynik dodatni żółto-pomarańczowe zabarwienie podłoża. Właściwości amonifikacyjne wykazały wszystkie szczepy (*Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4) wchodzące w skład kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich, natomiast amonifikację mocznika zaobserwowano tylko dla dwóch szczepów: *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1 i *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4 (Fig.15).

Aktywność enzymów hydrolitycznych, zaangażowanych w transformację materii organicznej, m.in. fosfataz, esteraz, aryamidaz, fosfohydrolazy, β -glukozydazy, β -galaktozydazy, mannozydazy, glukozaminidazy, poszczególnych szczepów bakterii składających się na kompozycję biopreparatu, określono za pomocą testów API ZYM (Biomerieux). Testy przeprowadzono w hodowlach szczepów bakteryjnych o zmętnieniu odpowiadającym 5-6 w skali McFerland'a w celu ustalenia ich spektrum enzymatycznego. Szczep *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4 wykazywał aktywność fosfatazy alkalicznej, esterazy C4 i C8, aryamidaz leucyny, waliny i cystyny, chemotrypsyny, fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy oraz α -glukozydazy. *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3 charakteryzował się aktywnością esterazy C4 i C8, aryamidazy leucyny, fosfatazy kwaśnej i fosfohydrolazy. Szczepy *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2 posiadały natomiast aktywność esterazy C4, C8 i C14, aryamidaz leucyny, waliny i cystyny, fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy, α -galaktozydazy, α -glukozydazy oraz α -mannozydazy. Szczep *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2 wykazywał ponadto aktywność trypsyny, β -galaktozydazy, β -glukozydazy oraz N-acetylo- β -glukozaminidazy (Fig.15, Fig. 7).

Przykład 4. Działanie antagonistyczne szczepów bakteryjnych wchodzących w skład kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich na roślinne patogeny grzybowe – eksperyment szalkowy

Szczepy wchodzące w skład biopreparatu, w postaci czystych kultur, zostały przebadane w kierunku zdolności do hamowania wzrostu szczepów grzybów

fitopatogenicznych: *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp. oraz *Verticillium* sp.. Właściwości antagonistyczne szczepów bakteryjnych będących składnikami biopreparatu, sprawdzono względem reprezentatywnej grupy fitopatogenów, wyizolowanych z polskich plantacji owoców miękkich w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki PAN. W badaniach wykorzystano dwa szczepy *Colletotrichum* sp. (G166/18, G172/18) izolowane z zakażonych owoców truskawki, trzy szczepy *Botrytis* sp. (G275/18, G276/18, G277/18) oraz trzy szczepy *Verticillium* sp. (G293/18, G296/18, G297/18) wyizolowane z zakażonych korzeni roślin truskawki.

Dla każdego szczepu wykonano posiewy celem obserwacji ich aktywności antagonistycznej. Antagonizm szczepów bakteryjnych wchodzących w skład biopreparatu względem izolatu danego patogenu zbadano parami na płytkach Petriego o średnicy 90 mm, na podłożu agarowym z wyciągiem ziemniaczanym (PDA – Potato Dextrose Agar). Całą powierzchnię podłoża na płytce zaszczipiano 100 µl zawiesiny zarodników danego grzyba fitopatogenicznego, o transmitancji 70%, a na środek płytki wyłożono jałowy krążek bibuły nasączony zawiesiną bakterii danego szczepu wchodzącego w skład kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich. Strefy zahamowania wzrostu patogenu grzybowego mierzono po 2-5 dniach hodowli w temperaturze 26°C.

Wszystkie z badanych szczepów bakteryjnych *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4 wykazały antagonistyczne działanie w stosunku do badanych patogenów w stopniu dobrym lub bardzo dobrym, hamując ich wzrost (Fig.16, Fig. 8-11).

Przykład 5. Działanie biostymulacyjne biopreparatu – stymulacja wzrostu roślin oraz działanie antagonistyczne szczepów bakteryjnych wchodzących w skład kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich na roślinne patogeny grzybowe – testy wazonowe

W celu określenia biostymulacyjnego działania biopreparatu na rośliny malin przeprowadzono eksperyment fitotronowy, w którym zastosowano następujące warianty doświadczalne: a) wariant bez naturalizacji, b) naturalizacja korzeni podczas sadzenia, c) naturalizacja korzeni podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne, d) podlewanie naturalizacyjne. Eksperyment wazonowy został wykonany z użyciem mieszaniny wszystkich czterech szczepów bakteryjnych (*Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1,

Arthrobacter sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4) wchodzących w skład kompleksu do naturalizacji ryzosfery owoców miękkich. Doświadczenie prowadzono przez 2 miesiące, w kontrolowanych warunkach temperatury 20-22°C, przy fotoperiodzie 16:8 (16 godzin światła i 8 godzin ciemności). W przykładzie wykonania biopreparat do naturalizacji ryzosfery malin zastosowano w dawce 10 ml na doniczkę biopreparatu zawierającego mieszaninę bakterii wchodzących w skład kompleksu do naturalizacji odpowiadającej następującej wielkości populacji każdej z bakterii wchodzących w skład formułacji: 10^6 jtk/ml na korzeń rośliny oraz na powierzchnię gleby, odpowiednio dla bezpośredniej aplikacji na korzeń rośliny oraz w przypadku podlewania naturalizacyjnego roślin. Przygotowane zawiesiny bakteryjne cechowały się zbliżoną gęstością optyczną na poziomie ~90% transmitancji, mierzoną za pomocą turbidymetru. Aplikacja biopreparatu w wariantach z bakteryjnym kompleksem do naturalizacji powodowała stymulację wzrostu roślin, zwłaszcza po zastosowaniu podlewania naturalizacyjnego (Fig. 12).

W celu określenia działania antagonistycznego szczepów bakteryjnych wchodzących w skład biopreparatu przeprowadzono najpierw kontaminację roślin i gleby wybranymi patogenami grzybowymi *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp. i *Verticillium* sp. W doświadczeniu zastosowano dwa warianty aplikacji biopreparatu do naturalizacji ryzosfery malin poprzez stosowanie bezpośrednie na korzenie roślin podczas sadzenia oraz poprzez podlewanie naturalizacyjne roślin rosnących w wazonach. Wyniki porównano do obiektów kontrolnych niezaszczepionych patogenami grzybowymi. Aplikacja biopreparatu bakteryjnego do naturalizacji pozwoliła ocenić wzrost roślin w warunkach stresu biotycznego spowodowanego obecnością patogenów grzybowych. Rośliny traktowane preparatem do naturalizacji charakteryzowały się lepszą kondycją i witalnością, w porównaniu do kontroli, w której nie stosowano biopreparatu do naturalizacji (Fig. 13-14). Efekt ten zaobserwowano w obu wariantach z zastosowaniem biopreparatu do naturalizacji, zarówno po bezpośredniej naturalizacji ryzosfery malin połączonej z podlewaniem naturalizacyjnym, jak też w wariantcie obejmującym tylko podlewanie naturalizacyjne. Zaobserwowano znaczną stymulację wzrostu zakażonych malin w doświadczeniu fitotronowym w warunkach stresu biotycznego wywołanego kontaminacją *Verticillium* sp. (G296/18) w wariantach obejmujących naturalizację korzeni, podlewanie naturalizacyjne oraz po zastosowaniu naturalizacji korzeni połączonej z podlewaniem naturalizacyjnym w porównaniu do obiektu kontrolnego, w którym nie zastosowano wyselekcjonowanych

szczepów bakterii, przy czym najlepsze efekty uzyskano w obiekcie, w którym zastosowano łączą aplikację kompleksu do naturalizacji (aplikacja na korzeń podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne podczas wzrostu roślin) (Fig. 13). W przypadku łącznego zastosowania patogenów *Botrytis* sp. (G277/18), *Colletotrichum* sp. (G172/18), *Phytophthora* sp. (G408/18), *Verticillium* sp. (G296/18) najlepszy efekt biostymulacyjny uzyskano w wariacie z podlewaniem naturalizacyjnym (Fig. 14).

Zaletą preparatu jest jego duża uniwersalność, potwierdzona tym, że jest on skuteczny wobec wielu patogenów występujących na plantacjach owoców miękkich, a także fakt, że jest on oparty o naturalne składniki z uwzględnieniem rodzimych szczepów bakteryjnych, wyodrębnionych z naturalnych siedlisk malin dzikorosnących, a tym samym przyjazny dla środowiska. Preparat dedykowany jest do naturalizacji i biostymulacji roślin maliny, jednakże może być stosowany również w innych uprawach roślin z grupy owoców miękkich.

Przykład 6. Konkurencyjność pokarmowa bakterii wchodzących w skład biopreparatu do naturalizacji ryzosfery malin w stosunku do roślinnych patogenów grzybowych

W celu wyboru odpowiednich suplementów do biopreparatu przeprowadzono badania dotyczące konkurencyjności pokarmowej między wyselekcjonowanymi pożytecznymi szczepami bakterii (*Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4), izolowanymi z ryzosfery malin dzikorosnących, a izolatami poszczególnych roślinnych patogenów grzybowych (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.), atakującymi plantacje owoców miękkich, biorąc pod uwagę stopień zużycia związków węglowych oraz intensywność wzrostu na różnych substratach zlokalizowanych na płytkach Biolog® FF MicroPlates (<https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/>) oraz GENIII (<https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/>). Płytki FF oraz GENIII opłaszczone substratami zaszczepiono zgodnie z protokołem producenta w powtórzeniach biologicznych, stosując trzy osobne płytki dla każdego izolatu bakteryjnego lub grzybowego. Po hodowli mikroorganizmów na płytkach przeprowadzono analizę uzyskanych wyników, obejmującą uśrednione z całego okresu hodowli odczyty absorbancji, przy różnych długościach fali, na podstawie których określono substraty

stanowiące mieszaninę prebiotycznych związków suplementacyjnych dla wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych, wchodzących w skład biopreparatu. W analizie wyników uwzględniono wspólne substraty, występujące na obu rodzajach płytek (FF i GENIII), a następnie określono przyrost biomasy mikroorganizmów na poszczególnych substratach, jak też stosunek obejmujący zużycie poszczególnych substratów do intensywności wzrostu na tych substratach, w celu wyłonienia związków stymulujących wzrost bakteryjnych szczepów wchodzących w skład biopreparatu przy jednoczesnym braku oddziaływania lub hamowaniu wzrostu fitopatogennych szczepów grzybów. Wykazano, że wyselekcjonowane szczepy pożytecznych bakterii charakteryzowały się bardzo dobrym wzrostem na substratach takich jak kwas bromobursztynowy, kwas jabłkowy, kwas glukarowy, kwas α -ketoglutarynowy, kwas γ -aminomasłowy, N-acetylo D-glukozaamina, przy jednoczesnym hamowaniu wzrostu lub braku odpowiedzi ze strony roślinnych patogenów grzybowych (Fig.17), co daje przewagę konkurencyjną pożytecznym bakteriom w stosunku do patogenów, w obecności tych substratów. Wyniki przeprowadzonych badań stanowiły podstawę do wytypowania wymienionych substratów jako dodatków do formulacji bakteryjnego kompleksu do naturalizacji ryzosfery malin, które poprawiają konkurencyjność *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4 w zasiedlaniu danej niszy ekologicznej.

Przykład 7. Sposób otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin – formulacja sucha nierozpuszczalna w wodzie

Do otrzymania bakteryjnego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach biostymulujących wzrost roślin, hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie oraz antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora*, zastosowano 4 wyselekcjonowane z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczające swojego działania następujące szczepy bakterii: *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, na liście sekwencji, dla których prowadzono osobne hodowle, które mieszano w równych proporcjach, w celu uzyskania kompozycji

zawierającej wyizolowane szczepy saprofitycznych bakterii ryzosfery malin dzikorosnących i/lub biopreparatu, a hodowle prowadzono w temperaturze w 30°C.

Po wstępnym namnożeniu bakterii na agarowym podłożu glukozowo-ziemniaczanym w ciągu 24-48 godzin w temperaturze 25-30°C, uzyskanym inokulum zaszczipiano podłoże namnażające i prowadzono hodowlę przez 72-96 godzin w temperaturze 30°C. Pożywką namnażającą do wytworzenia biopreparatu było podłoże mineralne M9 z mikroelementami: Mn, Zn, Cu, Co, Mo, zawierające dodatkowo NH_4NO_3 jako źródło azotu, uzupełnione sacharozą i trehalozą jako źródłem węgla, oraz trehalozą w celu ochrony komórek bakterii w procesie suszenia, przygotowane na supernatancie ziemi okrzemkowej stanowiącym odpad po filtracji piwa. Wariantowo zastosowano wodę wodociągową. Po hodowli, mającej na celu przygotowanie formułki suchej biopreparatu, wprowadzano 10% dekstrozy w stosunku do wagi uzyskanej hodowli, a następnie wysycano hodowlę gruboziarnistą ziemią okrzemkową, stanowiącą nośnik dla komórek bakterii w stosunku wagowym do kompozycji przeznaczonej do suszenia 1:2. Wysycone hodowle suszono w warunkach zoptymalizowanych w suszarce próżniowej tj. 50 mbar oraz 30°C do uzyskania suchej masy około 93% przez około 84 godziny, przy czym do suszarki wprowadzano chlorek wapnia jako środek pochłaniający wilgoć. W alternatywnym wariantcie wysycone hodowle suszono: *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4 i *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1 w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w ciągu 72 godzin w warunkach zwiększanej co 24-godziny temperatury, tak że pierwsze 24 godziny hodowla suszona była w temperaturze 35°C, następne 24-godziny w temperaturze 42°C, a kolejne 24-godziny w 50°C. Natomiast hodowle: *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3 suszono w suszarce próżniowej w ciągu 72 godzin w warunkach 50 mbar oraz 30°C, przy czym zastosowano środek pochłaniający wilgoć – bezwodny chlorek wapnia.

Wysuszone szczepy bakterii mieszano w zasadniczo równych proporcjach ilościowych. Dla zwiększenia konkurencyjności pokarmowej pożytecznych szczepów bakteryjnych zastosowano dodatek prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej, zawierającej w równym stosunku wagowym kwas jabłkowy, kwas α -ketoglutaryny, kwas γ -aminomasłowy, N-acetylo D-glukozaaminę, którą dodano do biopreparatu w ilości 1% końcowej masy biopreparatu.

Przykład 8. Sposób otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin – formułacja rozpuszczalna w wodzie

Sposób prowadzono jak w Przykładzie 7, z tym że po zakończeniu hodowli i wysyceniu dekstrozą, która stanowiła $10\% \pm 5\%$ w stosunku do wagi uzyskanej hodowli, dla uzyskania rozpuszczalnej formułacji suchej do oprysku bądź zraszania, jako nośnik bakterii zastosowano zamiast ziemi okrzemkowej dekstrozę z prebiotycznymi dodatkami suplementacyjnymi.

Przykład 9. Biopreparat bakteryjny do naturalizacji ryzosfery malin, formułacja nierozpuszczalna w wodzie

Otrzymany sposobem opisanym w Przykładzie 7. biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach biostymulujących wzrost roślin oraz antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, oraz właściwościach hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie, zawierający szczepy bakteryjne składa się z:

- 4 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, nie działających na siebie antagonistycznie szczepów bakterii: *Arthrobacter* sp. B58/18 - sekwencja nr 1, *Arthrobacter* sp. B75/18 - sekwencja nr 2, *Pseudomonas* sp. B37/18 - sekwencja nr 3, *Rhodococcus* sp. B12/18 - sekwencja nr 4, hodowanych na podłożu mineralnym M9 z mikroelementami z dodatkiem: sacharozy w ilości $30\text{ g} \pm 10\%$, trehalozy w ilości $34\text{ g} \pm 10\%$, oraz NH_4NO_3 w ilości $6\text{ g} \pm 10\%$ w 1 litrze; gdzie po hodowli zawiesinę biomasy bakteryjnej uzupełnia się korzystnie 10% dekstrozy w celu poprawy przeżywalności bakterii w procesie suszenia;
- ziemi okrzemkowej stosowanej jako nośnik w proporcji 1:2 w stosunku wagowym do hodowli bakterii;
- dodatku prebiotycznej mieszanki suplementacyjnej zawierającej w równym stosunku wagowym kwas jabłkowy, kwas α -ketoglutarynowy, kwas γ -aminomasłowy, N-acetylo-D-glukozaaminę, stanowiącego 1% końcowej masy biopreparatu.

Do biopreparatu, w celu kształtowania jego właściwości, można także dodawać znane i stosowane w tym celu środki, takie jak konserwanty, środki poprawiające przyczepność czy inne substancje pomocnicze.

Przykład 10. Biopreparat bakteryjny do naturalizacji ryzosfery malin, formułacja rozpuszczalna w wodzie

Biopreparat otrzymany sposobem według Przykładu 9. posiada skład analogiczny jak wskazano w Przykładzie 9, z tym że zamiast nośnika bakterii w postaci ziemi okrzemkowej nośnikiem jest dekstroza z prebiotycznymi dodatkami suplementacyjnymi.

ZASTRZEŻENIA PATENTOWE

1. Sposób otrzymywania bakteryjnego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin, biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin, o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, **znamienny tym**, że stosuje się:

- 4 wyselekcjonowane z ryzosfery malin dzikorosnących, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Rhodococcus* sp. B12/18, o sekwencjach odpowiednio nr 1-4, wskazanych na liście sekwencji, hodowane na mineralnym podłożu namnażającym z mikroelementami i dodatkiem źródła węgla i azotu, przygotowanym na wodzie albo na supernatancie ziemi okrzemkowej, stanowiącej odpad po filtracji piwa, suszone na nośniku;

- dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: kwasu jabłkowego, kwasu α -ketoglutarynowego, kwasu γ -aminomasłowego, N-acetylo D-glukozyaminy albo ich dowolną mieszaninę.

2. Sposób otrzymywania biopreparatu wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, o sekwencjach odpowiednio nr 1-4, wskazanych na liście sekwencji, polegający na ich hodowli na podłożu namnażającym ze źródłem węgla i azotu, związkami mineralnymi, suszeniu na nośniku oraz suplementacji dodatkami wspomagającymi konkurencyjność pokarmową szczepów stanowiących kompozycję biopreparatu, przy czym szczepy bakterii namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu glukozowoziemniaczanym, w temperaturze 25-30°C, przez 24-48 godzin, a następnie tak przygotowanym inokulum zaszczepia się mineralne podłoże namnażające i prowadzi się hodowlę wytrząsaną w warunkach tlenowych, w temperaturze 25-30°C, w czasie 72-96 godzin, korzystnie 72 godzin przy 120 rpm.

3. Sposób otrzymywania biopreparatu wg. dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że mineralne podłoże namnażające zawiera w 1 litrze jako źródło węgla: sacharozę w ilości 30 g \pm 10% i trehalozę w ilości 34 g \pm 10%, a jako źródło azotu: NH_4NO_3 w ilości 6 g \pm 10%.

4. Sposób otrzymywania biopreparatu wg. dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że mineralne podłoże namnażające zawiera mikroelementy: Mn, Zn, Cu, Co, Mo.

5. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że po zakończeniu hodowli wysyca się ją dekstrozą, która stanowi 10% \pm 5% w stosunku do wagi uzyskanej hodowli, a następnie ziemią okrzemkową, korzystnie gruboziarnistą, w stosunku wagowym do kompozycji przeznaczony do suszenia 1:2, stanowiącymi nośnik dla komórek bakterii.
6. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z zastrz. 1-4, **znamienny tym**, że po zakończeniu hodowli wysyca się ją dekstrozą, która stanowi 10% \pm 5% w stosunku do wagi uzyskanej hodowli, a następnie, dla uzyskania rozpuszczalnej formułacji suchej do oprysku bądź zraszania, jako nośnik bakterii stosuje się dekstrozę albo maltodekstrynę albo mieszaninę dekstrozy albo maltodekstryny z prebiotycznymi dodatkami suplementacyjnymi.
7. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że hodowle wysycone nośnikami suszy się w warunkach obniżonego ciśnienia, wynoszącego 50 mbar w temperaturze 30°C do uzyskania około 93% suchej masy.
8. Sposób otrzymywania biopreparatu według zastrz. 7, **znamienny tym**, że do procesu suszenia wprowadza się środek pochłaniający wilgoć.
9. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że stosuje się wysuszoną i zawieszoną na nośnikach biomasę każdego ze szczepów *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Rhodococcus* sp. B12/18 o sekwencjach odpowiednio nr 1-4, wskazanych na liście sekwencji zmieszaną w równym stosunku wagowym.
10. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz. **znamienny tym**, że stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej w równym stosunku wagowym kwas jabłkowy, kwas α -ketoglutarynowy, kwas γ -aminomasłowy, N-acetylo D-glukozaaminę.
11. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz. **znamienny tym**, że stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu w ilości 0,1-2%, korzystnie 1% końcowej masy biopreparatu.
12. Bakteryjny biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin, biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin, o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora*, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, **znamienny tym**, że zawiera 4 wyselekcjonowane z ryzosfery malin dzikorosnących, nie

wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Rhodococcus* sp. B12/18, o sekwencjach odpowiednio nr 1-4, wskazanych na liście sekwencji, hodowane na mineralnym podłożu z mikroelementami i dodatkiem źródła węgla i azotu, przygotowanym na wodzie albo na supernatancie ziemi okrzemkowej, stanowiącej odpad po filtracji piwa, suszone na nośniku, oraz dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: kwasu jabłkowego, kwasu α -ketoglutarynowego, kwasu γ -aminomasłowego, N-acetylo D-glukozyaminy albo ich dowolną mieszaninę.

13. Bakteryjny biopreparat według zastrz. 12, **znamienny tym**, że szczepy bakteryjne *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Rhodococcus* sp. B12/18, o sekwencjach odpowiednio nr 1-4, wskazanych na liście sekwencji, występują w równym stosunku wagowym.

14. Bakteryjny biopreparat według zastrz. 12 albo 13, **znamienny tym**, że dodatek mieszanki suplementacyjnej zawiera w równym stosunku wagowym: kwas jabłkowy, kwas α -ketoglutarynowy, kwas γ -aminomasłowy, N-acetylo D-glukozyaminę.

15. Bakteryjny biopreparat według dowolnego z zastrz. 12-14, **znamienny tym**, że dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu wynosi 0,1-2%, korzystnie 1% końcowej masy biopreparatu.

16. Bakteryjny biopreparat według dowolnego z zastrz. 12-15, **znamienny tym**, że ma postać suchą nierozpuszczalną w wodzie.

17. Bakteryjny biopreparat według zastrz. 18, **znamienny tym**, że zawiera, jako nośnik bakterii, ziemię okrzemkową, korzystnie gruboziarnistą.

18. Bakteryjny biopreparat według dowolnego z zastrz. 12-16, **znamienny tym**, że ma postać suchą rozpuszczalną w wodzie.

19. Bakteryjny biopreparat według zastrz. 18, **znamienny tym**, że zawiera, jako nośnik bakterii, dekstrozę albo maltodekstrynę albo mieszaninę dekstrozy albo maltodekstryny z prebiotycznymi dodatkami suplementacyjnymi.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1

Szczep B58/18 - sekwencja nr 1 *Arthrobacter* sp.

Sekwencja 16S rDNA

TGCTTGCACCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGC
CCTTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTCC
TCATCGCATGGTGGGGGGTGGAAAGCTTTTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGGC
CTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAG
AAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
AGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGG
ATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCA
GGTCTCTGGGCATTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGG
ACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA
CATGGACCGGACCGCCGCAGAAATGTGGTTTTCTCCTTTTGGGGCCGGTTCACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTAGTGGTGGGGACTCATG
GGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCA
TGCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTG
CGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGG
GTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAA
CGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGA
AAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTG

Sekwencja nr 2

B75/18 - sekwencja nr 2 *Arthrobacter* sp.

Sekwencja 16S rDNA

GGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATCCCAGC
 TTGCTGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTT
 GACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCGTCTGA
 CGCATGTCAGGTGGTGGAAAGCTTTTGTGGTTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATC
 AGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGA
 GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCG
 CGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTCTTTCAGTAGGGAAGAAGC
 GAAAGAACGGTACCT

Sekwencja nr 3

Szczep B37/18 - sekwencja nr 3 *Pseudomonas* sp.

Sekwencja 16S rDNA

TACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
 CTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTA
 CGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCG
 GATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGT
 CTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA
 GGGCATTAAACCTAATACGTTGGTGTCTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG
 GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
 AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATC
 CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAG
 AGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAG
 CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
 CAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGT
 TGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGG
 GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAATCTGCTAGAGATAGCGGAGTGCCTTCG
 GGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
 TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTTAA

GGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGT
CGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGAT
CGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCATGGGA

Sekwencja nr 4

Szczep B12/18 - sekwencja nr 4 *Rhodococcus* sp.

Sekwencja 16S rDNA

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTT
CGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGC
ACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCCTRTG
GCATGGTGGGAGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCC GCGGCCTATC
AGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCG
CGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCG
CAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGT

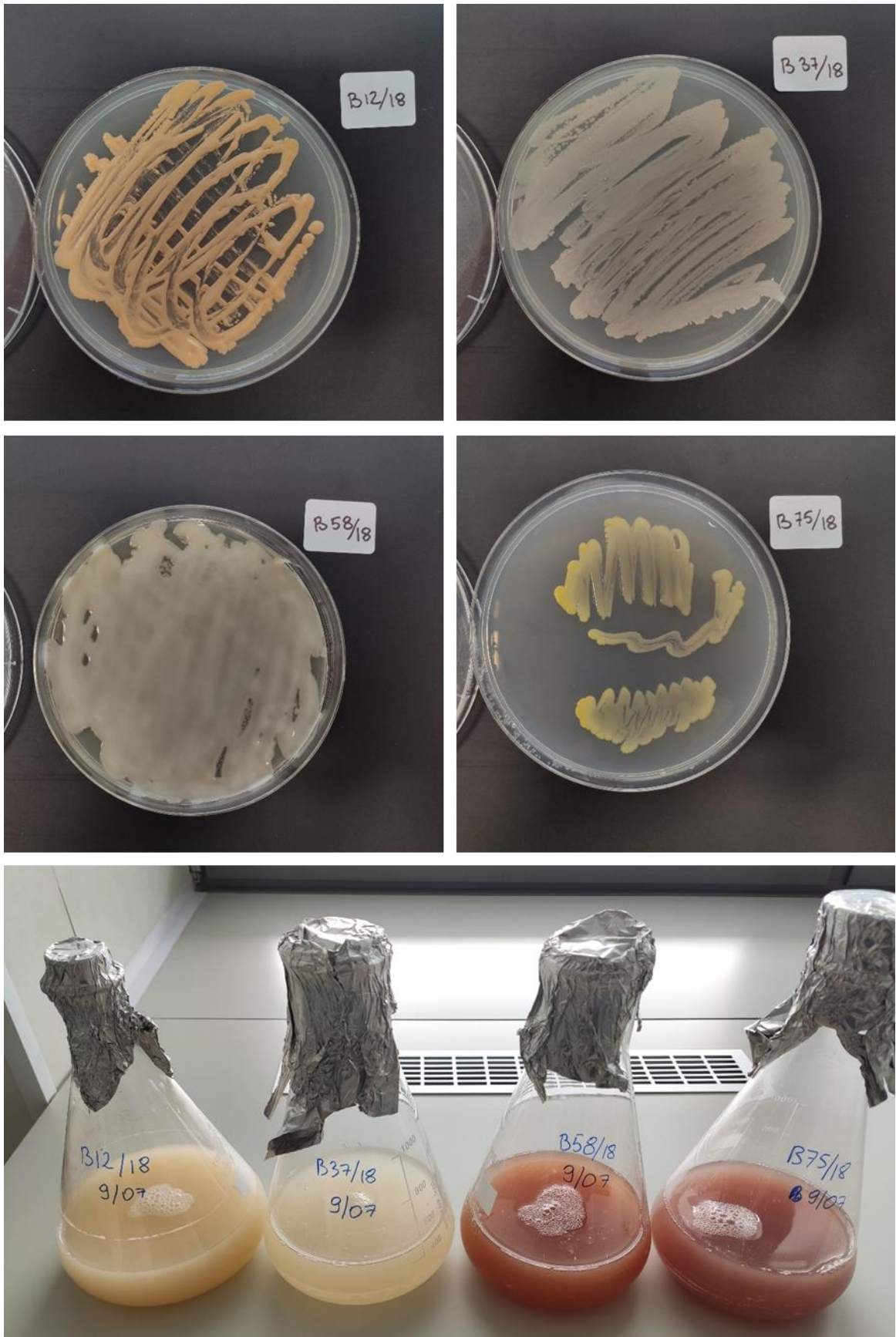


Fig. 1

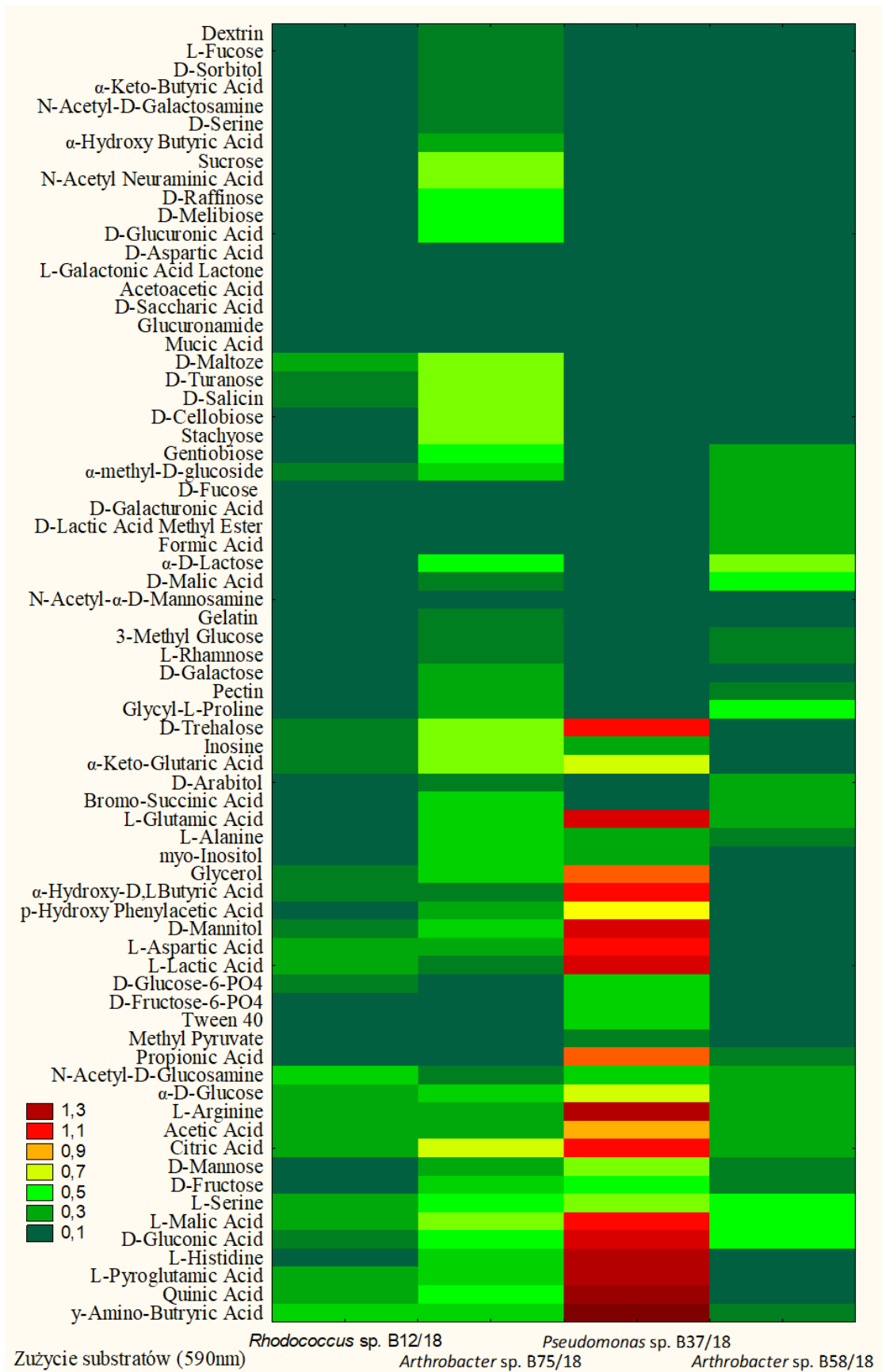


Fig. 2

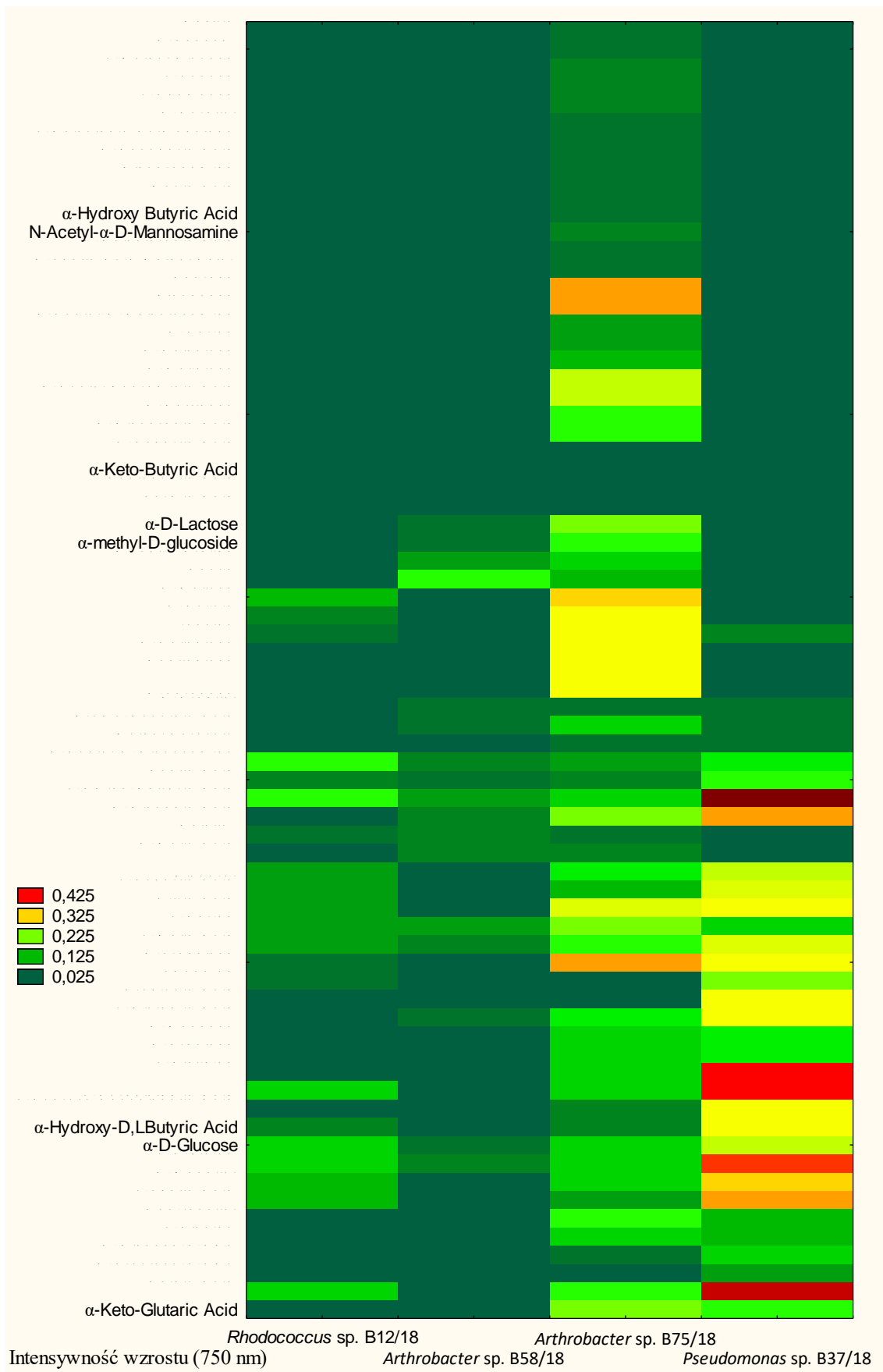


Fig. 3

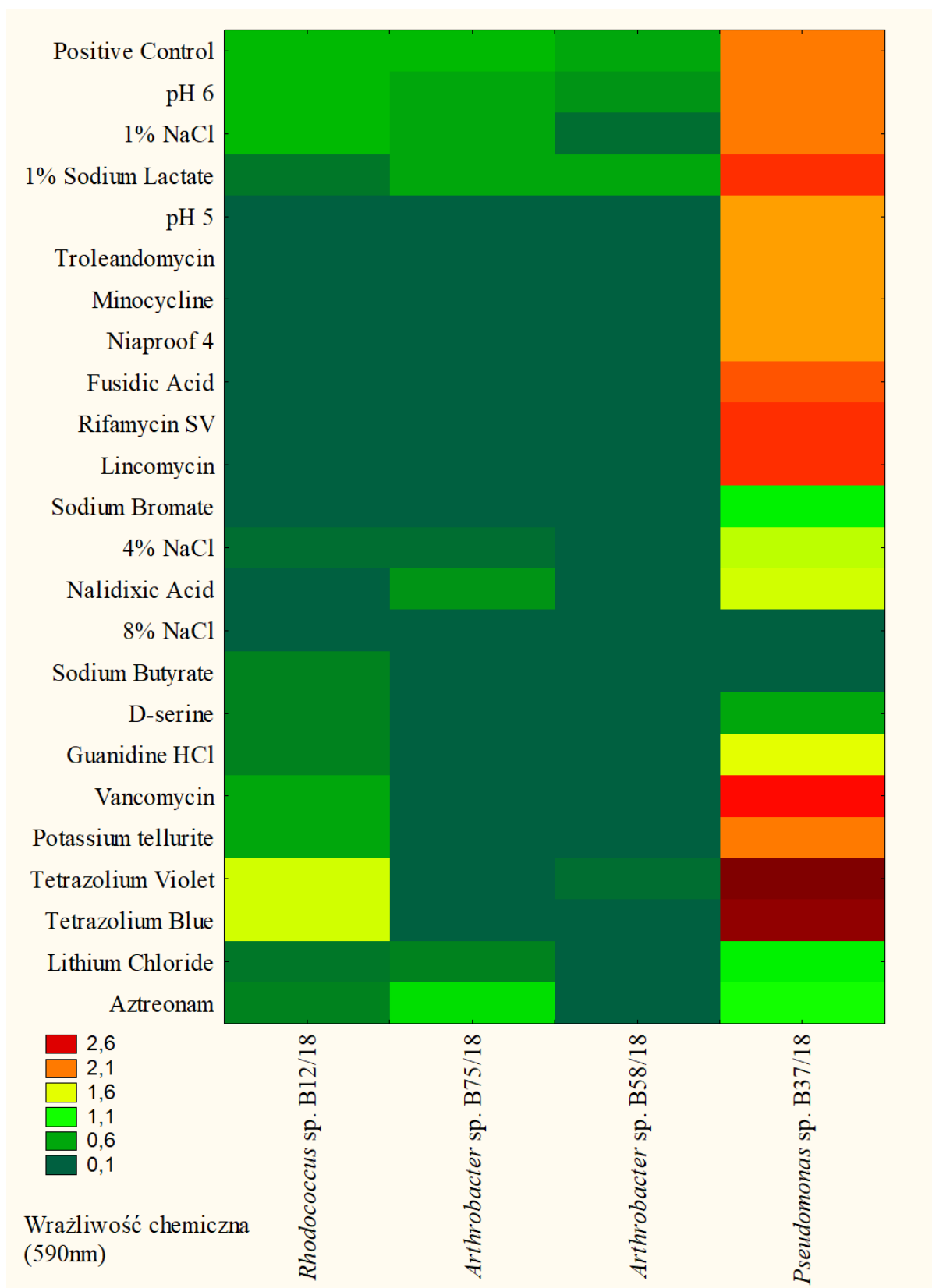


Fig. 4

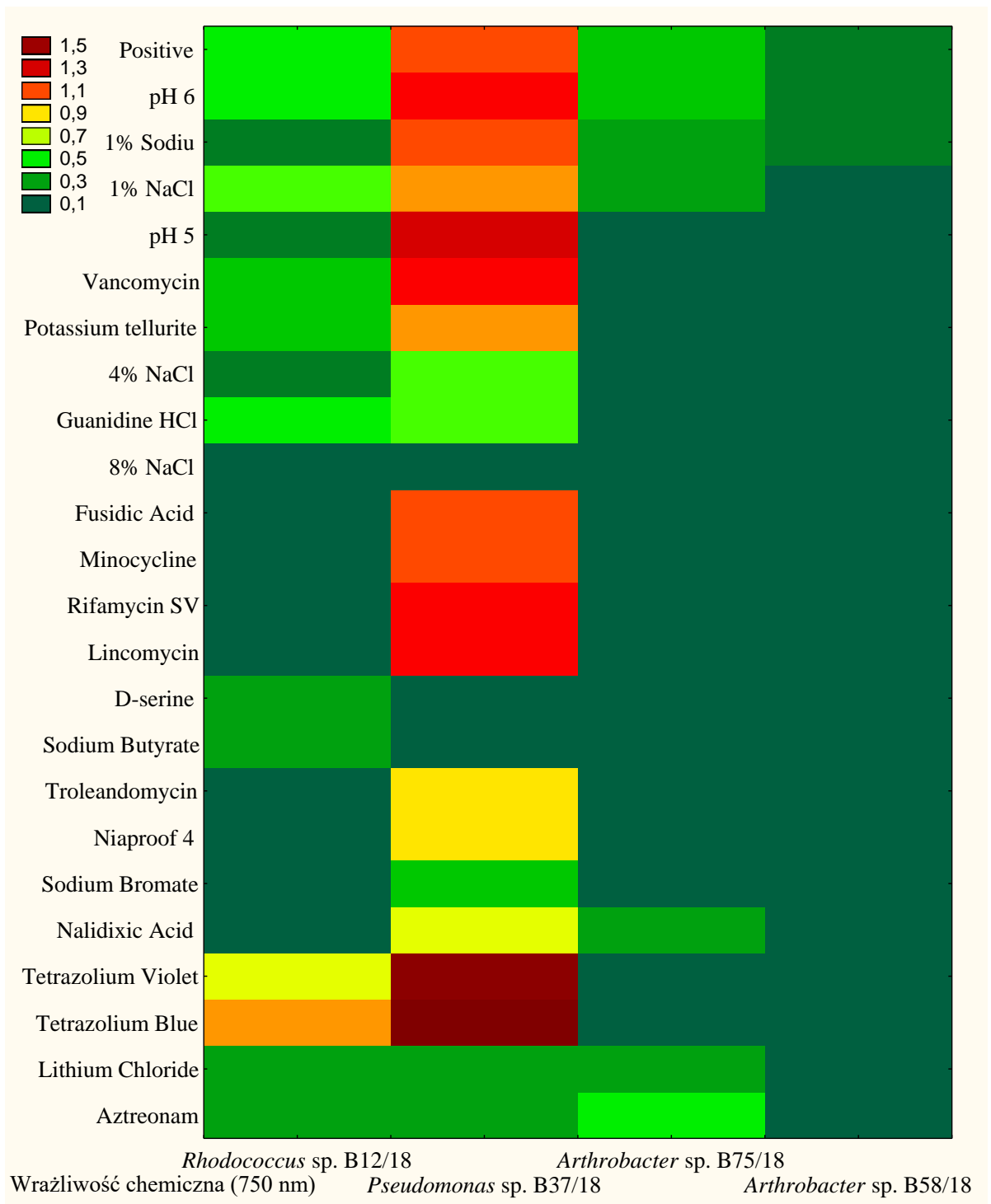


Fig. 5

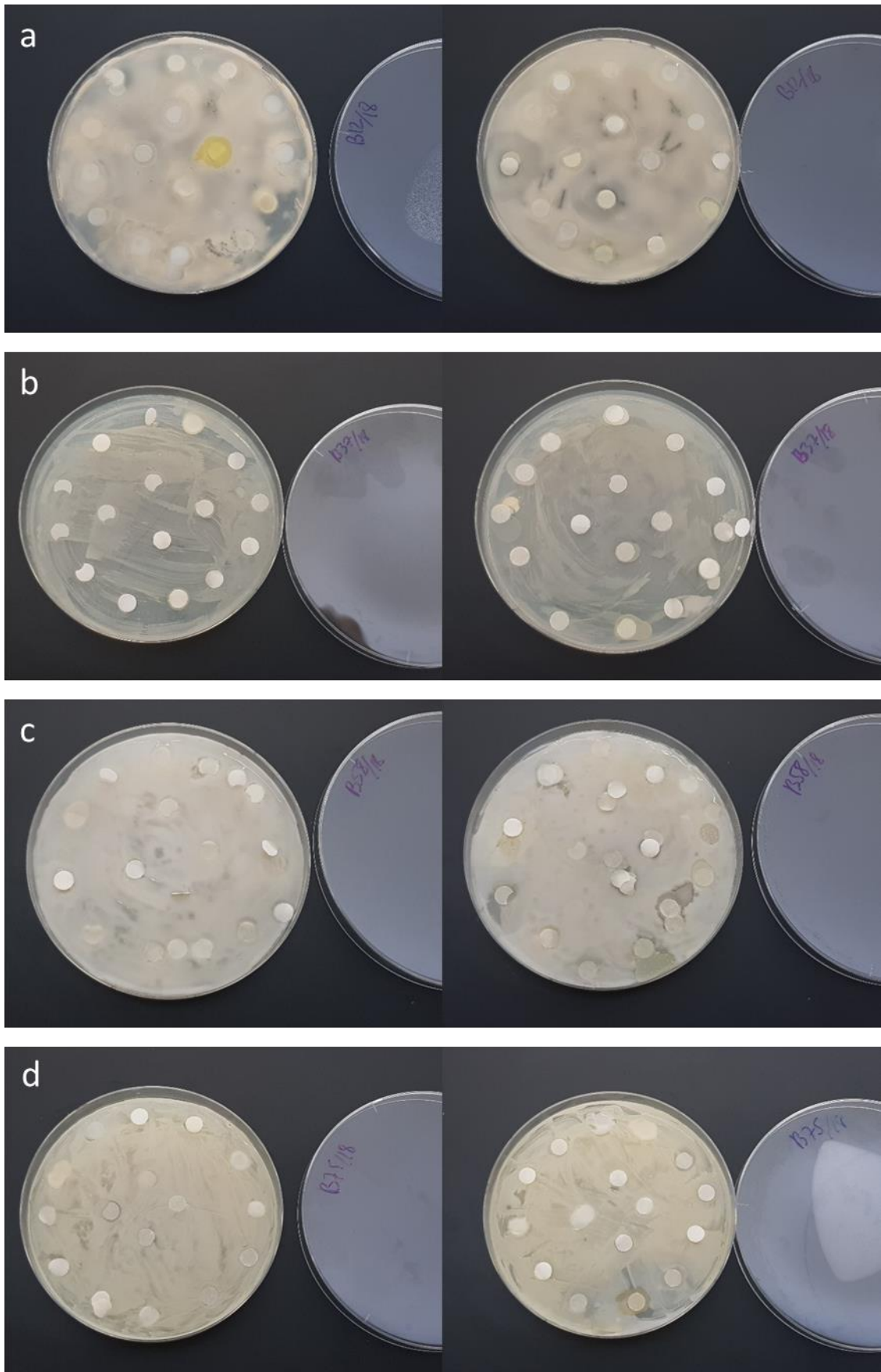


Fig. 6

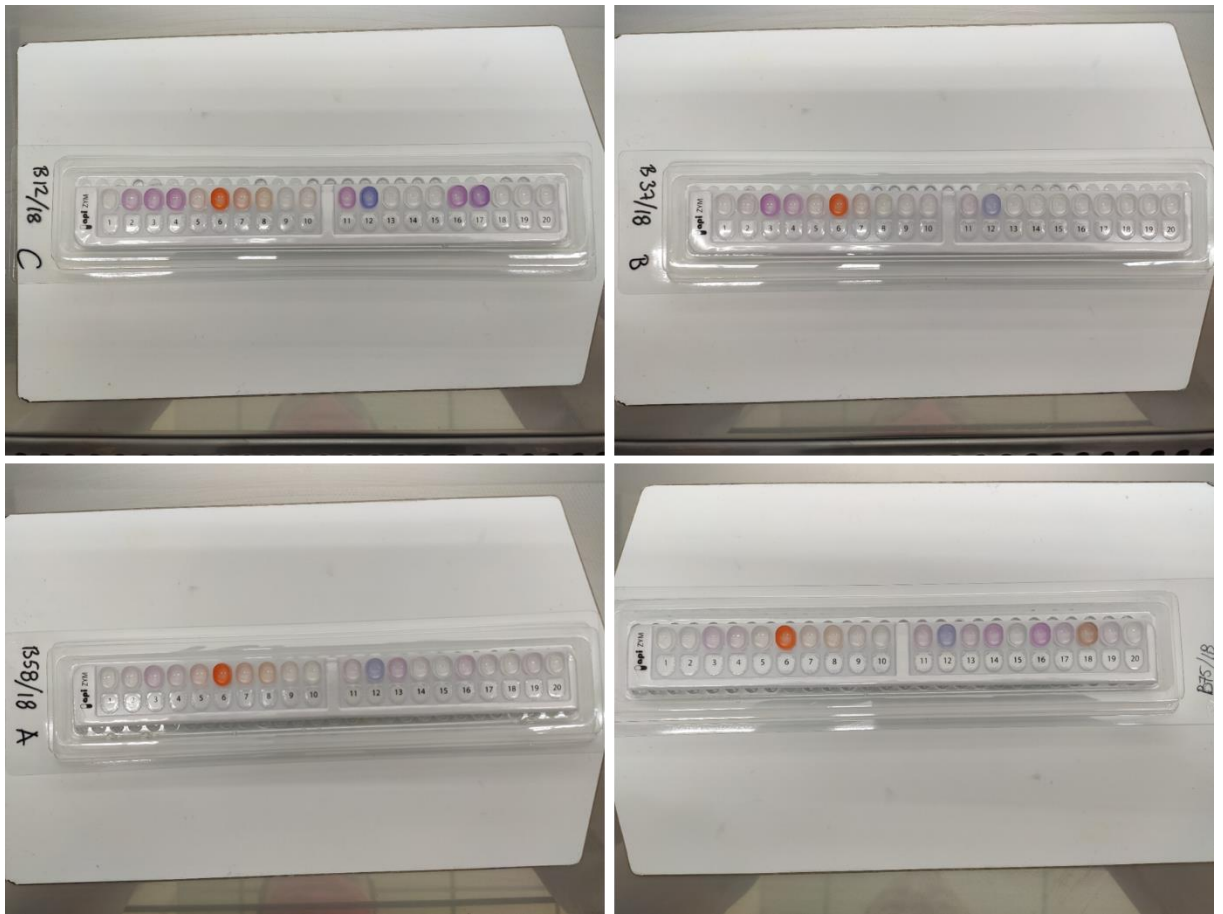


Fig. 7

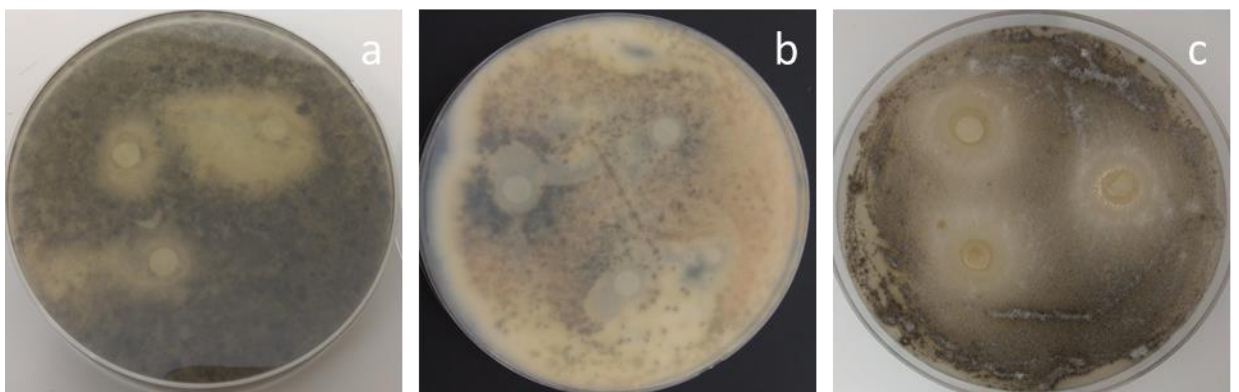


Fig. 8

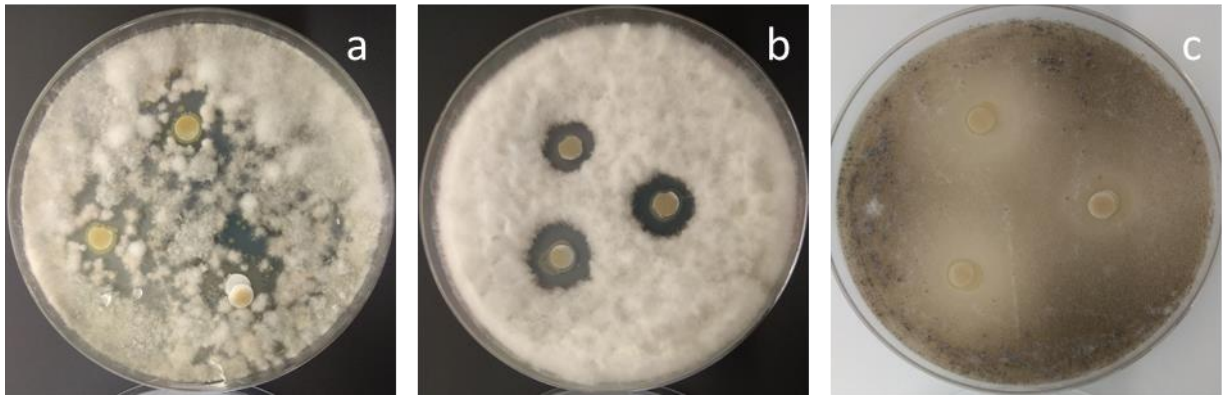


Fig. 9

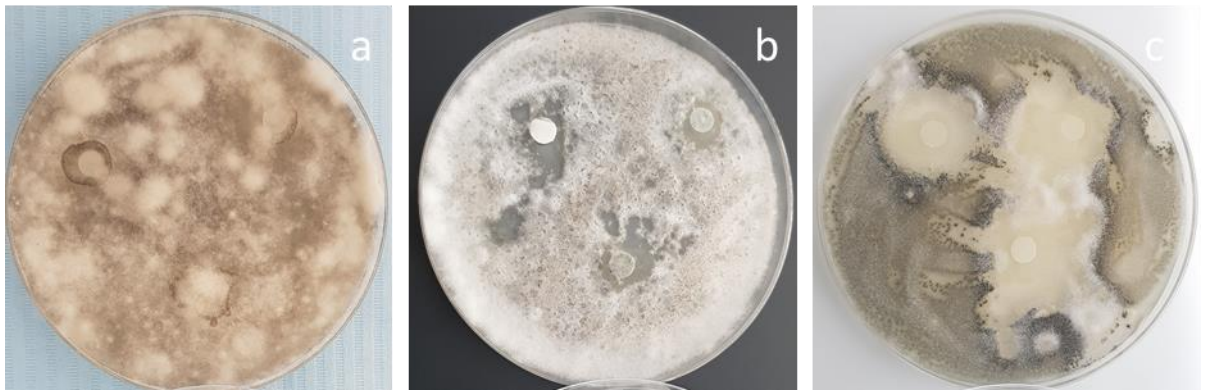


Fig. 10

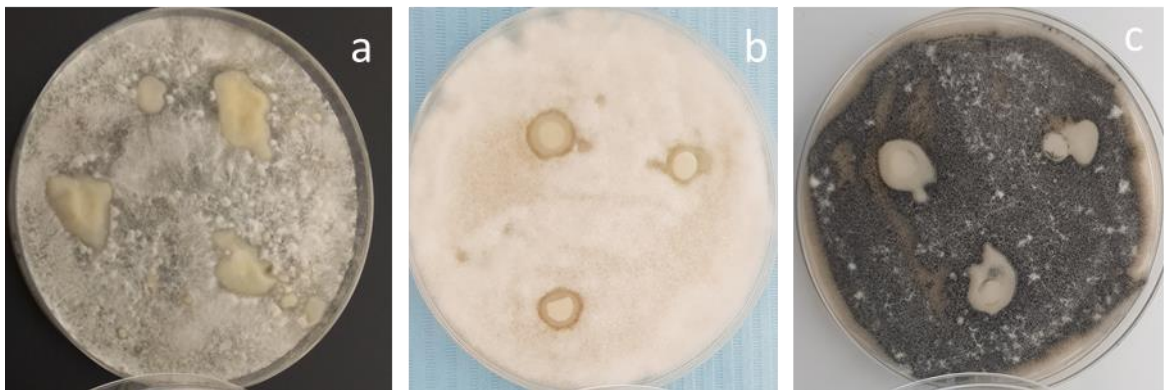


Fig. 11

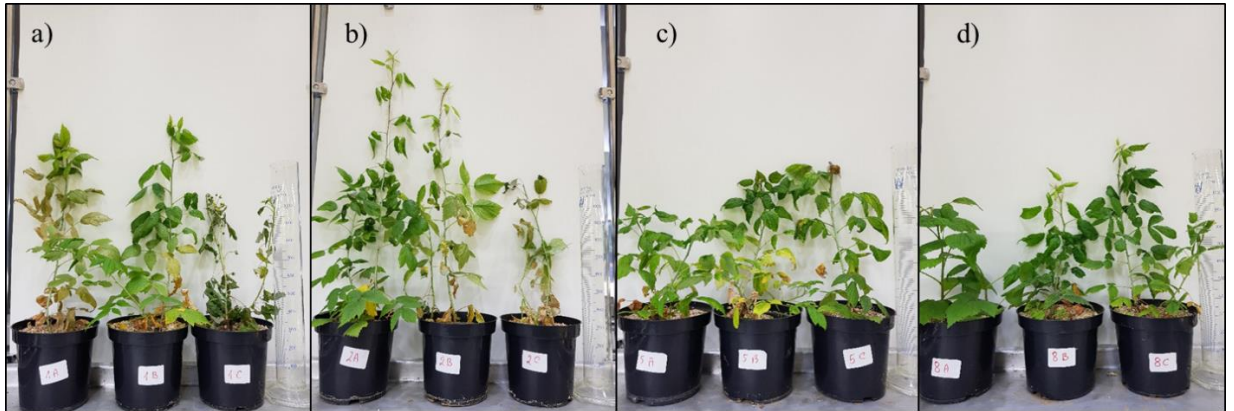


Fig. 12

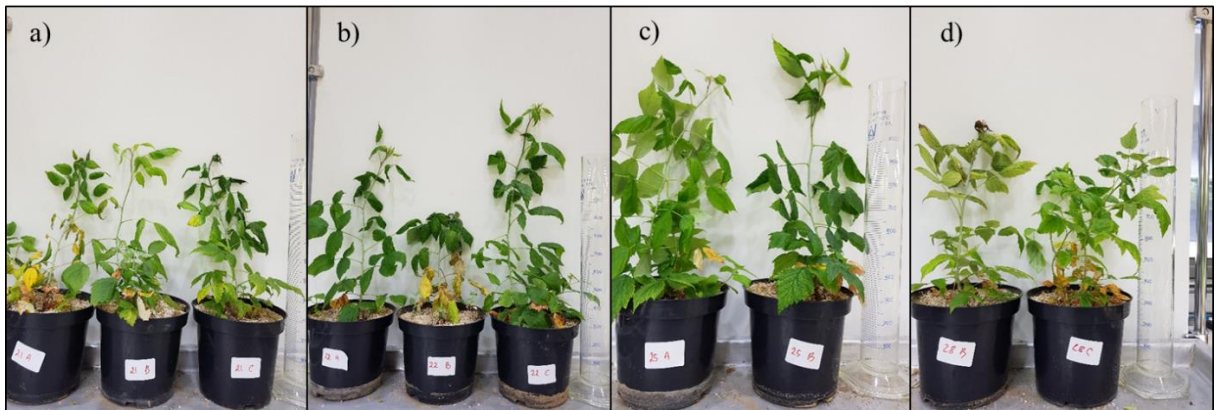


Fig. 13

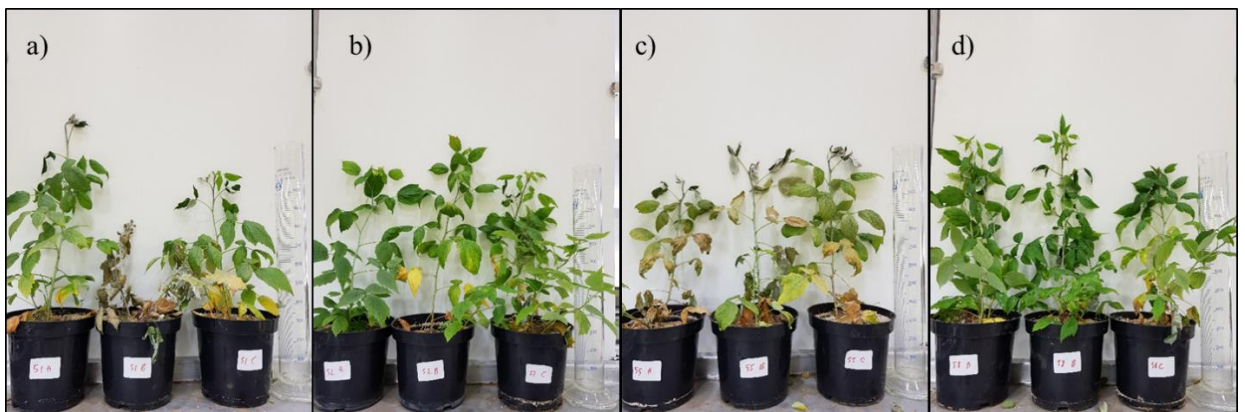


Fig. 14

Zdolności metaboliczne	Dodatek do podłoża	<i>Rhodococcus</i> sp. B12/18		<i>Pseudomonas</i> sp. B37/18		<i>Arthrobacter</i> sp. B58/18		<i>Arthrobacter</i> sp. B75/18	
		24h	168h	24h	168h	24h	168h	24h	168h
Zdolności proteolityczne	Mleko odtłuszczone	-	-	+	+++	-	-	+	++
	Żelatyna	-	-	+++	+++	-	+	++	++
Zdolności amylolityczne	Skrobia	-	-	++	+++	+	++	-	-
Zdolności amonifikacyjne	Mleko odtłuszczone	+	+	+++	+++	++	++	+	+++
	Mocznik	++	++	-	-	+	+	-	-
Zdolności denitryfikacyjne	Azotan potasu	+	+	-	-	+	++	++	+++
Zdolności celulolityczne	Rozdrobniona słoma	-	+	+	+++	++	+++	+	++
Aktywność enzymatyczna	Zastosowany substrat	<i>Rhodococcus</i> sp. B12/18	<i>Pseudomonas</i> sp. B37/18	<i>Arthrobacter</i> sp. B58/18	<i>Arthrobacter</i> sp. B75/18				
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-fenyloalanino-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-glukopiranozyd	+++	-	-	+				
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.15

<i>Botrytis</i> sp.	Bakteria		Strefa zahamowania wzrostu (mm)	Odchylenie standardowe	<i>Verticillium</i> sp.	Bakteria		Strefa zahamowania wzrostu (mm)	Odchylenie standardowe		
G275/18	<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	0,0	0,0	G293/18	<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	9,2	1,0		
	<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	0,0	0,0			<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	26,5	2,1	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	0,0	0,0			<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	12,6	2,2	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	10,4	11,5			<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	7,6	6,6	
G277/18	<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	13,5	3,8		G296/18	<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	14,2	2,5	
	<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	0,0	0,0				<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	20,7	2,9
	<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	14,0	4,1			<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	8,5	1,0	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	19,1	16,7			<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	12,2	3,0	
G276/18	<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	20,1	2,0			G297/18	<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	12,9	1,0
	<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	0,0	0,0					<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	19,4
	<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	0,0	0,0		<i>Arthrobacter</i> sp.		B58/18	30,9	1,0	
<i>Colletotrichum</i> sp.	Bakteria	Strefa zahamowania wzrostu (mm)	Odchylenie standardowe	G296/18		<i>Arthrobacter</i> sp.		B75/18	0,0	0,0	
					<i>Arthrobacter</i> sp.				B75/18	9,3	10,3
					<i>Rhodococcus</i> sp.				B12/18	7,4	0,3
					<i>Pseudomonas</i> sp.				B37/18	0,0	0,0
G172/18	Bakteria	Strefa zahamowania wzrostu (mm)	Odchylenie standardowe	G296/18	<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18		0,0	0,0		
							<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	12,5	4,9	
							<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	0,0	0,0	
							<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	9,3	1,4	
G371/18	Bakteria	Strefa zahamowania wzrostu (mm)	Odchylenie standardowe	G297/18	<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	0,0	0,0			
							<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	0,0	0,0	
							<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	13,5	2,6	
							<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	0,0	0,0	
G166/18	Bakteria	Strefa zahamowania wzrostu (mm)	Odchylenie standardowe	G297/18	<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	0,0	0,0			
							<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	11,6	1,6	
							<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	13,0	1,2	
							<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	10,2	1,2	
G166/18	Bakteria	Strefa zahamowania wzrostu (mm)	Odchylenie standardowe	G297/18	<i>Arthrobacter</i> sp.	B75/18	0,0	0,0			
							<i>Rhodococcus</i> sp.	B12/18	11,6	1,6	
							<i>Pseudomonas</i> sp.	B37/18	13,0	1,2	
							<i>Arthrobacter</i> sp.	B58/18	10,2	1,2	

Fig.16


<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Botrytis</i> spp.			<i>Colletotrichum</i> spp.			<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.			
B12/18	B37/18	B58/18	B75/18	G275/18	G276/18	G277/18	G166/18	G172/18	G371/18	G408/18	G293/18	G296/18	G297/18	SUBSTRATE
0,00	0,16	8,60	0,00	2,05	2,91	3,84	17,67	0,00	11,44	0,00	13,91	8,50	12,38	Bromosuccinic Acid
0,00	0,90	8,37	1,12	1,23	1,60	1,49	1,19	1,53	1,29	1,86	6,82	3,48	3,42	D-Arabitol
0,00	0,00	3,17	1,47	1,55	1,44	1,20	1,81	1,65	1,16	1,24	2,53	2,05	2,42	D-Cellobiose
9,32	0,00	1,56	2,14	0,00	1,85	4,14	2,38	2,98	1,74	1,93	2,27	2,08	2,31	Dextrin
22,84	0,00	18,46	4,45	1,39	1,42	1,24	1,80	1,53	1,73	1,30	1,64	1,61	1,67	D-Fructose
0,00	0,00	0,00	0,81	1,38	1,42	1,37	1,35	1,59	1,31	1,39	1,61	1,59	1,65	D-Galactose
0,00	0,00	16,97	1,82	1,65	1,95	1,43	2,49	2,03	1,78	1,64	0,00	0,00	0,00	D-Galacturonic Acid
0,00	0,00	30,14	4,43	1,54	2,16	49,57	1,73	3,40	2,35	7,11	2,18	1,99	2,04	D-Glucuronic Acid
0,00	0,00	9,94	11,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	D-Lactic Acid Methyl Ester
0,00	0,00	7,43	0,00	2,70	2,92	4,66	4,80	5,24	2,59	6,13	2,09	2,07	2,11	D-Malic Acid
2,31	24,86	19,51	1,43	1,36	1,42	1,40	1,18	1,42	1,33	1,30	2,44	2,23	3,00	D-Mannitol
3,30	3,76	7,48	0,46	1,62	1,54	1,34	3,28	1,90	1,55	1,31	1,73	1,66	1,80	D-Mannose
0,00	0,00	0,00	0,72	1,70	1,43	1,43	1,34	1,55	1,21	1,41	1,46	1,38	1,51	D-Melibiose
6,03	0,00	2,70	4,74	1,40	1,45	1,34	1,24	1,39	1,33	1,23	1,52	1,51	1,52	D-Raffinose
0,00	0,00	54,50	0,30	1,69	2,76	7,70	2,04	8,50	2,57	0,00	3,58	3,63	2,64	D-Saccharic Acid
19,00	0,00	0,00	3,72	1,38	1,36	1,20	1,46	1,93	1,41	1,22	6,71	7,47	6,36	D-Sorbitol
3,76	0,00	4,15	0,76	1,76	1,43	1,54	1,76	1,30	1,35	1,71	1,52	1,56	1,54	D-Trehalose
68,20	0,00	9,61	1,29	1,56	1,50	1,46	2,40	1,65	1,41	1,23	1,68	1,57	1,70	Gentiobiose
0,00	0,00	17,05	1,44	0,00	0,00	3,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Glucuronamide
2,50	6,47	0,00	1,82	1,39	1,63	1,27	1,66	1,57	1,63	1,33	1,70	1,97	1,96	Glycerol
3,82	1,17	19,17	2,52	2,26	2,19	1,89	1,48	1,77	1,43	1,78	2,10	2,42	2,59	L-Alanine
3,44	2,93	24,17	3,13	3,09	5,22	4,05	2,85	3,28	2,69	0,00	3,35	3,70	3,56	L-Aspartic Acid
0,00	0,00	127,57	2,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	2,33	3,91	L-Fucose
0,00	2,46	9,13	2,01	2,27	2,42	2,00	2,94	5,13	1,63	3,34	3,23	2,46	3,97	L-Glutamic Acid
3,42	3,41	0,00	3,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,15	0,00	255,50	5,43	14,76	L-Lactic Acid
3,01	30,46	8,28	1,94	0,00	4,90	0,00	6,63	5,89	2,83	0,00	3,94	3,92	4,49	L-Malic Acid
2,34	5,90	0,00	1,19	0,00	0,00	0,00	2,19	1,82	1,80	0,00	0,00	0,00	0,00	L-Pyroglutamic Acid
0,00	0,00	82,45	1,45	1,27	1,47	1,33	1,26	1,18	1,25	1,20	1,53	1,51	1,58	L-Rhamnose
3,30	0,52	6,45	0,86	1,92	24,50	3,03	2,28	2,96	1,90	6,94	2,58	2,54	2,82	L-Serine
0,00	0,00	15,67	2,02	1,50	1,73	3,20	1,16	1,40	1,23	1,49	1,56	1,78	1,70	N-Acetyl-DGalactosamine
2,23	0,00	3,99	1,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	N-Acetyl-DGlucosamine
0,00	0,00	6,17	0,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	N-Acetyl-DMannosamine
2,26	0,00	11,40	1,71	1,57	1,94	1,74	1,41	1,70	1,30	2,57	3,61	2,65	2,87	Quinic Acid
21,00	0,00	5,45	1,23	1,37	1,33	1,43	1,33	1,62	1,26	1,34	1,46	1,46	1,50	Stachyose
9,46	0,00	3,71	1,57	1,45	1,40	1,46	1,68	1,53	1,73	1,32	1,54	1,55	1,56	Sucrose
1,51	4,07	8,24	4,45	1,56	1,40	1,41	1,70	1,33	1,18	1,46	1,62	1,62	1,68	α -D-Glucose
139,50	0,00	13,03	0,98	1,42	1,39	1,33	1,46	1,83	1,41	1,26	0,00	0,00	0,00	α -D-Lactose
5,97	0,00	0,00	1,42	78,29	5,07	0,00	3,80	5,58	8,88	21,06	8,26	5,57	6,92	α -Keto-glutaric Acid
38,80	0,00	7,34	1,09	1,79	1,51	1,73	1,49	1,68	1,44	1,45	1,52	1,44	1,54	β -Methyl-DGlucoside
2,00	0,00	1,74	1,64	1,41	7,05	3,19	1,39	1,38	1,43	2,17	2,11	2,30	2,50	γ -Amino-butyrac Acid

Fig.17

SKRÓT OPISU

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania bakteryjnego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin, biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin, poprawiającego jakość gleby, w tym transformacje materii organicznej, o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, w którym stosuje się 4 wyselekcjonowane z ryzosfery malin dzikorosnących, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Arthrobacter* sp. B58/18, *Arthrobacter* sp. B75/18, *Pseudomonas* sp. B37/18, *Rhodococcus* sp. B12/18, o sekwencjach odpowiednio nr 1-4, wskazanych na liście sekwencji, hodowane na mineralnym podłożu namnażającym z mikroelementami i dodatkiem źródła węgla i azotu, przygotowanym na wodzie albo na supernatancie ziemi okrzemkowej, stanowiącej odpad po filtracji piwa, suszone na nośniku. Ponadto stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: kwasu jabłkowego, kwasu α -ketoglutarynowego, kwasu γ -aminomasłowego, N-acetylo D-glukozyaminy albo ich dowolną mieszaninę. Przedmiotem wynalazku jest ponadto bakteryjny biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin.

(19 zastrzeżeń)