

BacilEkstra

Sposób otrzymywania bakteryjnego biopreparatu i biopreparat bakteryjny do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu patogenów: *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania bakteryjnego biopreparatu i bakteryjny biopreparat do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby, przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych fitopatogenów w uprawie owoców miękkich, zawierający szczepy bakteryjne *Bacillus* spp. o właściwościach antagonistycznych w stosunku do grzybów fitopatogenicznych z rodzaju: *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* oraz lęgniowców z rodzaju *Phytophthora*, a także zawierający wyciągi roślinne i kwasy humusowe, wykazujące również cechy biostymulacji roślin.

Owoce miękkie, w tym truskawki i maliny należą do bardzo popularnych owoców deserowych oraz przetwórczych. Owoce truskawki są cennym źródłem witaminy C, tanin, flawonoidów, antocyjanów, katechin, kwercytyny, kwasów organicznych (cytrynowego, jabłkowego, szczawiowego, salicylowego oraz elagowego) jak również minerałów (potasu, fosforu, wapnia, sodu oraz żelaza) (*Vergara M., Vargas J., Acuna J. Physicochemical characteristics of strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) fruits from four production zones in Cundinamarca, Colombia. Agronomia Colombiana 36 (3), 227-236, 2018*). Owoce malin posiadają właściwości prozdrowotne, w tym cechują się działaniem przeciwutleniającym i przeciwzapalnym. Z uwagi na właściwości oraz wyjątkowy smak tych owoców, są surowcem chętnie kupowanym w celach bezpośredniej konsumpcji jak również w celach przetwórczych. W związku z tym, uprawa owoców miękkich odgrywa bardzo ważną rolę w produkcji rolniczej na świecie jak również w Polsce. Według

FAOSTAT Polska jest piątym producentem malin na świecie i liderem w Unii Europejskiej. Natomiast dane Głównego Urzędu Statystycznego wskazują, że Polska jest drugim po Hiszpanii największym producentem truskawek w Unii Europejskiej i dziewiątym na świecie, których zbiory mieszczą się w granicach 175 000 – 205 000 ton, a wartość eksportu truskawek świeżych i mrożonych oraz przetworów truskawkowych wyniosła w 2020 roku 174 mln euro.

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 Hort. 1309, 701-710, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1309.101>*). Duża część gleb UE jest obecnie zagrożona ze względu na niezrównoważone użytkowanie i stosowane praktyki gospodarowania, zagrażające zdrowiu gleb (Panagos P., Montanarella L., Barbero M., Schneegans A., Aguglia L., Jones A., 2022, *Soil priorities in the European Union. Geoderma Regional 29 (2022) e00510, <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2022.e00510>*). Jak podkreśliła Komisja Europejska w misji programu Horyzont Europa w zakresie zdrowia gleby i żywności „Troska o glebę to troska o życie”, 60-70% gleb UE jest w stanie niezdrowym (European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, Veerman, C., Pinto Correia, T., Bastioli, C., et al., 2020. *Caring for soil is caring for life: ensure 75% of soils are healthy by 2030 for healthy food, people, nature and climate: interim report of the mission board for soil health and food, publications office. <https://doi.org/10.2777/918775>*). Zgodnie z najnowszym raportem dotyczącym rolnictwa regeneracyjnego istnieje pilna potrzeba odbudowy zdrowia gleb oraz ich bioróżnorodności (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*). **Uprawy owoców miękkich są narażone ponadto na patogeny grzybowe i grzybopodobne takie jak: *Botrytis* spp., *Verticillium* spp. *Colletotrichum* spp. czy *Phytophthora* spp., które wywołują straty ekonomiczne obniżając ilość zebranych owoców o odpowiedniej jakości jak również mogą powodować porażenia całych plantacji i usychanie roślin. Najważniejsze choroby roślin powodowane przez fitopatogeny grzybowe to szara pleśń, wertycilioza, antraknoza i fytoftoroza (Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2019. *Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting***

Berry Crops - A Review. Molecules, 24, 1200.). Dodatkowo producenci ekologiczni zobowiązani są w ramach *Rozporządzenia Rady Wspólnoty Europejskiej nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej* do ograniczenia stosowania nawozów mineralnych oraz środków chemicznych na korzyść wykorzystania preparatów o naturalnym pochodzeniu, w tym zawierających kompozycje mikrobiologiczne.

Z przeglądu literatury wynika, że bakterie z rodzaju *Bacillus* są często wykorzystywane w preparatach mikrobiologicznych stosowanych w uprawie roślin. Te mikroorganizmy należą do grupy bakterii promujących wzrost i rozwój roślin (PGPR – Plant Growth Promoting Rhizobacteria) usprawniają udostępnianie roślinom składników odżywczych obecnych w glebie, ponadto pozytywnie wpływają na rozwój systemu korzeniowego oraz uaktywniają formy niedostępnego fosforu (*Gutierrez-Manero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F. R., Talon M., 2001. The plantgrowth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiological active gibberellins. Physiologia Plantarum, 111: 206–211.* Co więcej niektóre gatunki/szczepy mogą wykazywać właściwości antagonistyczne przeciwko grzybom (*Gajbhiye A., Alok R., Meshram S., Dongre A.B. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. World Journal of Microbial Biotechnology 26 (7), 2010, 1187-1194.*

W obecnym stanie wiedzy opisano, że wśród bakterii z rodzaju *Bacillus* można znaleźć szczepy, które charakteryzują się zdolnościami antagonistycznymi przeciwko różnym fitopatogenom grzybowym, jednakże nie jest to cecha oczywista i wyłonienie odpowiednich szczepów wymaga szeregu badań. Poniżej przedstawiono kilka przykładów wykorzystania szczepów *Bacillus* spp. do walki z patogenami grzybowymi.

Rodzaj *Bacillus* jest intensywnie badaną grupą bakterii o dużym potencjale wykorzystania w ochronie roślin przed patogenami. Między innymi z uwagi na fakt, że mikroorganizmy należące do tego rodzaju występują niemal we wszystkich typach gleb, charakteryzują się dużą tolerancją na wysokie temperatury, szybko się namnażają w płynnych pożywkach oraz wytwarzają przetrwalniki. 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*).

Izolat glebowy *Bacillus velezensis* (AH2 CECT-7221) charakteryzował się aktywnością przeciwgrzybową przeciwko różnym patogenom powodującym choroby roślin, takich jak grzyby z rodzajów: *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Thielaviopsis* oraz *Botryosphaeria*. Preparat uzyskany na bazie zawiesiny przetrwalników szczepu AH2 CECT-7221 zachowywał swoją aktywność oraz żywotność przez 6 miesięcy w temperaturze przechowywania nie wyższej niż 30°C (Fernandez Martinez A.I., Villaverde Fernandez M.J., Casanova Roca J.A., Lopez-Roman J.M., Nicolas Martinez J.A., Blanca Pico I., *Pure culture of strain AH2 of the Bacillus Velezensis species and a product for the biological control of phytopathogenic fungi*, 2013, US Patent: US 8,404,476 B2).

Kolejnym przykładem wykorzystania szczepów z rodzaju *Bacillus* jest sucha formacja 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).

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 Khusro i in. (*Indian Journal of Research*, 2013, 2(11) 243-244) opisali zwiększoną produkcję metabolitów antymikrobiologicznych przez gatunek *B. methylotrophicus*.

W tabeli poniżej przedstawiono zestawienie preparatów komercyjnych dostępnych na rynku, które zawierają szczepy z rodzaju *Bacillus* i są wykorzystywane w zwalczaniu/ochronie roślin przed patogenami grzybowymi.

Produkt (nazwa handlowa)	Producent	Skład
Serenade ®	AgraQuest	<i>B. subtilis</i> QST713
Ecoguard ®	Novozyme	<i>B. licheniformis</i> SB3088

Kodiak ®	Gustafson	<i>B. subtilis</i> GB03
Yield Shield ®	Gustafson	<i>B. pumilus</i> GB34
Bio Yield ®	Gustafson	<i>B. amyloliquefaciens</i> GB 99, <i>B. subtilis</i> GB 122
Subtilex ®	Beker Underwood	<i>B. subtilis</i> MB 1600
Hi stick L + Subtilex ®	Beker Underwood	<i>B. subtilis</i> MB1600+ <i>Rhizobium</i>

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

Najczęściej patenty dotyczą biopreparatów wykorzystywanych do zwalczania patogenów roślin warzywnych i uprawnych, a brak jest rozwiązań, obejmujących działanie na bioróżnorodność mikrobiologiczną gleby i korzeni 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 wszystkich czterech 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, ekstraktów roślinnych i kwasów humusowych w celu poprawy skuteczności saprotroficznych bakterii pochodzących z ryzosfery roślin, względem fitopatogenów roślin owoców miękkich.

Celem wynalazku jest zatem opracowanie biopreparatu do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich, wykazującego cechy biostymulacji roślin.

Prowadząc badania nad bioproduktami 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 w połączeniu z innymi naturalnymi komponentami 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 biopreparatu 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 biopreparatu. Przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania unikalnego, zoptymalizowanego składu podłoża płynnego do hodowli bakterii, nośników i innych składników, które doprowadziły do uzyskania unikalnej kompozycji poszczególnych składników biopreparatu, które warunkują właściwości i oryginalność opracowanego rozwiązania, stanowiąc jednocześnie zastrzeżenie patentowe.

Istotą sposobu otrzymywania bakteryjnego biopreparatu 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 subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – 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 i nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej i rozpuszczalnej w wodzie;
- dodatek ekstraktów roślinnych z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz dodatek kwasów humusowych jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

Sposób korzystnie obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, o sekwencjach odpowiednio nr 1 i 2, wskazanych na liście sekwencji, 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 zawiera korzystnie w 1 litrze: 20g serwatki, 6,6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 1g NH₄Cl, 0,5g NaCl, 0,022g CaCl₂, 0,18g MgSO₄, 12,9mg FeCl₂, w granicach ±10% każdego ze składników podłoża.

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

Podłoże namnażające z serwatką zawiera korzystnie mikroelementy: Mn, Zn, Cu, Co i Mo. Po otrzymaniu miana hodowli namnażającej nie mniejszego niż 10⁹ jtk/ml przeprowadza się etap indukcji przetrwalnikowania, korzystnie podwyższając temperaturę hodowli do 40°C 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 biopreparatu.

Korzystnym jest, gdy po zakończeniu hodowli, dodaje się jako komponent nośnika ekstrakty roślinne z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz kwasy humusowe, które w zależności od formulacji biopreparatu mają postać płynną albo suchą.

Postać płynną otrzymuje się poprzez połączenie 390-410 ml zawiesiny przetrwalników każdego szczepu bakteryjnego: *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD o nr 1 i 2 na liście sekwencji i po 45-55 ml każdego z ekstraktów z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz 45-55 ml płynnych kwasów humusowych.

Korzystnie, otrzymaną postać płynną poddaje się stabilizacji zabezpieczającej przed rozwojem przetrwalników poprzez obniżenie odczynu preparatu do pH=4,0-4,5, stosując kwas mlekowy.

Wariantowo 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 wysuszone albo liofilizowane bakterie o koncentracji nie mniejszej niż 10^{11} jtk/g, a wysuszone albo liofilizowane bakterie dodaje się w równych ilościach do uzyskania biopreparatu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie 10^8 – 10^{11} jtk/g.

Do postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika korzystnie stosuje się suche ekstrakty z pokrzywy, skrzypu, nagietka oraz suche kwasy humusowe w ilości odpowiednio 0,045-0,055 g/kg; 0,045-0,055 g/kg; 0,12-0,13 g/kg oraz 0,55-0,65 g/kg biopreparatu, a jako nośnik wszystkich komponentów biopreparatu stosuje się dolomit mikronizowany, stanowiący dopełnienie do 1 kg biopreparatu.

W innym wariantcie dla uzyskania postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie, jako krioprotektant bakterii w procesie suszenia rozpyłowego albo liofilizacji oraz nośnik wszystkich komponentów biopreparatu, stosuje się maltodekstrynę, a wysuszone/liofilizowane bakterie o koncentracji nie mniejszej niż 10^{11} jtk/g dodaje się w równych ilościach do uzyskania biopreparatu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie 10^8 – 10^{11} jtk/g.

Do postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika korzystnie stosuje się suche ekstrakty z pokrzywy, skrzypu, nagietka oraz suche kwasy humusowe w ilości odpowiednio 0,045-0,055 g/kg; 0,045-0,055 g/kg; 0,12-0,13 g/kg oraz 0,55-0,65 g/kg biopreparatu, a maltodekstryna jako krioprotektant bakterii i nośnik właściwy stanowi dopełnienie do 1 kg biopreparatu.

Istota bakteryjnego biopreparatu 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, zawierającego szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, **polega na tym**, że zawiera dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, nośnik właściwy w postaci podłoża hodowlanego dla postaci płynnej biopreparatu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie oraz zawiera dodatek ekstraktów roślinnych z pokrzywy, skrzypu i nagietka i dodatek kwasów humusowych jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego, 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.

Biopreparat korzystnie zawiera szczepy bakteryjne w równym stosunku wagowym dla postaci suchej albo w równym stosunku objętościowym dla postaci płynnej biopreparatu.

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.

Postać płynna korzystnie zawiera w 1 litrze po 45-55 ml dodatku każdego z płynnych ekstraktów z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz płynnych kwasów humusowych.

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

Korzystnie postać sucha rozpuszczalna albo nierozpuszczalna w wodzie zawiera dodatek suchych ekstraktów z: pokrzywy w ilości 0,045-0,055 g/kg, skrzypu w ilości 0,045-0,055 g/kg i nagietka w ilości 0,12-0,13 g/kg oraz suchych kwasów humusowych w ilości 0,55-0,65 g/kg.

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

W wariacie postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie biopreparat zawiera maltodekstrynę jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i jako nośnik właściwy.

Szczepy *Bacillus* spp. (AF75AB2 oraz Sp115AD), wykorzystane do opracowania biopreparatu są izolatami środowiskowymi i zostały wyselekcjonowane w Instytucie Ogrodnictwa (IO) w Skierniewicach i ujawnione w kolekcji SYMBIOBANK IO tego Instytutu.

Otrzymany preparat w formie płynnej i suchej umożliwia zwalczanie czterech istotnych patogenów owoców miękkich, w tym 3 grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* oraz 1 lęgniowca z rodzaju *Phytophthora* oraz wpływa na utrzymanie i/lub poprawę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby. Należy podkreślić, że nie ma na rynku dostępnych biopreparatów 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 korzeni daje możliwość oceny wpływu na bioróżnorodność mikrobiologiczną korzeni. Stąd przedstawione w niniejszym zgłoszeniu patentowym podejście jest unikatowe i innowacyjne i potwierdza korzystny wpływ opracowanego biopreparatu na środowisko glebowe i roślinę. Biopreparat stosuje się dolistnie (poprzez opryskiwanie bądź zraszanie) lub/i pod roślinę poprzez podlewanie, przy czym w przypadku formułacji suchej należy uprzednio sporządzić zawiesinę biopreparatu w wodzie, korzystnie 2-5 kg biopreparatu na 700-800 l niechlorowanej wody na 1 ha uprawy.

W korzystnym sposobie kontroli patogenów roślin lub utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby lub/i korzeni lub cech istotnych dla biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin biopreparat stosuje się w ilości korzystnie 5-10 l/ha (10^9 jtk/ml) dla preparatu płynnego, przy czym biopreparat 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 biopreparatu, przy czym w postaci podlewania i/lub oprysku/zraszania/irygacji biopreparat można korzystnie rozcieńczyć wodą w zależności od potrzeb.

Wynalazek został uwidoczniony w przykładach wykonania na rysunkach, gdzie:

Fig.1 przedstawia wygląd kultur szczepów bakteryjnych AF75AB2 i Sp115AD na podłożu PCA (Plate Count Agar), hodowla 48-godzinna;

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 przykładowe profile aktywności enzymatycznej szczepów bakteryjnych będących składnikami biopreparatu, określone na podstawie testów API ZYM (Biomérieux);

Fig.7 przedstawia tabelę prezentującą właściwości metaboliczne szczepów bakteryjnych wchodzących w skład biopreparatu;

Fig.8 przedstawia antagonizm bakteryjnego biopreparatu płynnego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*;

Fig.9 przedstawia tabelę dotyczącą antagonizmu biopreparatu, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD 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 bakteryjnego biopreparatu, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD w postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie (nośnik – maltodekstryna) wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora* bezpośrednio po wytworzeniu biopreparatu;

Fig.11 przedstawia antagonizm bakteryjnego biopreparatu, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD 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 biopreparatu w temperaturze pokojowej (około 21°C), 35°C oraz 4°C;

Fig.12 przedstawia antagonizm bakteryjnego biopreparatu, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD 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 biopreparatu w temperaturze 35°C;

Fig.13 przedstawia efektywną liczbę gatunków (ENS) bakterii w ryzosferze malin po zastosowaniu bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.14 przedstawia efektywną liczbę gatunków (ENS) grzybów w ryzosferze malin po zastosowaniu bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.15 przedstawia względny skład procentowy grup troficznych grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.16 przedstawia występowanie gildii funkcjonalnych w grupach obejmujących patotrofy grzybowe występujące w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.17 przedstawia względną obfitość typów bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.18 przedstawia względną obfitość klas bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.19 przedstawia względną obfitość rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.20 przedstawia względną obfitość typów grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.21 przedstawia względną obfitość klas grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.22 przedstawia względną obfitość rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji bakteryjnego biopreparatu zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD.

PRZYKŁADY

Przykład 1. Identyfikacja oraz charakterystyka biochemiczna szczepów bakterii będących składnikami biopreparatu do ochrony bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich

Szczepy bakterii wyselekcjonowane z ryzosfery roślin, pochodzące z kolekcji SYMBIO BANK Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach, wytypowane do wykorzystania w biopreparacie zidentyfikowano do rodzaju/gatunku z wykorzystaniem amplifikacji genu 16S rDNA oraz sekwencjonowania metodą Sanger. Uzyskane sekwencje nukleotydowe przeanalizowano poprzez porównanie ich z sekwencjami nukleotydowymi z komercyjnej bazy danych MicroSeq^{LD} oraz ogólnie dostępną, otwartą bazą NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Szczepy bakterii wybrane do wytworzenia biopreparatu 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 biopreparat szczepy bakterii AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz Sp115AD – sekwencja nr 2, charakteryzujące się bardzo dobrym wzrostem o ciemnokremowym (AF75AB2) i jasnokremowym (Sp115AD) zabarwieniu na podłożu PCA (Fig. 1), na podstawie analizy molekularnej i bioinformatycznej zidentyfikowano do gatunku: *Bacillus subtilis* AF75AB2 oraz rodzaju *Bacillus* sp. Sp115AD, uzyskane sekwencje nukleotydowe przedstawiono na Liście Sekwencji.

Szczepy bakteryjne wchodzące w skład preparatu (*Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 2) zostały scharakteryzowane pod kątem aktywności fizjologicznej i biochemicznej poprzez określenie zdolności do wykorzystania (utleniania) 71 substratów węglowych należących do grup związków: aminokwasów, alkoholi cukrowych, węglowodanów, kwasów cukrowych, pochodnych cukrowych oraz kwasów karboksylowych (Fig.2) oraz stopnia wzrostu w obecności tych

substratów, mierzonego przyrostem biomasy bakterii (Fig.3). Określono również wrażliwość chemiczną wybranych szczepów bakteryjnych wobec 23 wybranych związków chemicznych (antybiotyków i barwników). Zahamowanie procesów oddechowych bakterii przedstawiono za pomocą profilu intensywności oddechowej na poszczególnych związkach chemicznych (Fig.4), natomiast profil wrażliwości chemicznej określony poprzez stopień zahamowania wzrostu bakterii w obecności badanych związków zaprezentowano na Fig.5.

Ponadto, określono zdolności enzymatyczne wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych. Za pomocą testów API ZYM (Biomerieux) określono aktywności enzymów hydrolitycznych uczestniczących w przemianach materii organicznej, m.in. fosfataz, esteraz, aryamidaz, fosfohydrolazy, β -glukozydazy, β -galaktozydazy, mannozydazy, glukozaminidazy szczepów bakterii stanowiących komponenty biopreparatu (Fig.6). Zdolności enzymatyczne oznaczono w hodowlach szczepów bakteryjnych o gęstości 5-6 w skali McFarland'a. Szczep *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 wykazywał wysoką aktywność fosfatazy alkalicznej, esterazy, esterazy lipazy, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI, α - i β -glukozydazy. Natomiast szczep *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja 2, charakteryzował się wysoką aktywnością esterazy, esterazy lipazy, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI (Fig.7).

Przykład 2. Określenie antagonizmu szczepów bakteryjnych wchodzących w skład biopreparatu wobec roślinnych patogenów grzybowych i grzybopodobnego lęgniowca – eksperyment szalkowy

Zdolności antagonistyczne biopreparatu zawierającego konsorcjum bakterii złożonego ze szczepów *Bacillus subtilis* AF75AB2 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD, będących komponentami preparatu, określono w stosunku do izolatów środowiskowych patogenów, wyizolowanych z ekologicznych plantacji owoców miękkich w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki PAN. Badania antagonizmu biopreparatu w postaci płynnej, suchej nierozpuszczalnej w wodzie oraz suchej rozpuszczalnej w wodzie, przeprowadzono wobec następujących grzybów: *Botrytis* sp. (G277/18 i/lub G276/18), *Verticillium* sp. (G297/18 i/lub G296/18), *Colletotrichum* sp. (G166/18 i/lub G171/18) oraz grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora* sp. (G408/18 i/lub G184/21), wyizolowanych z porażonych chorobowo korzeni roślin owoców miękkich.

Antagonizm określano na płytkach Petriego o średnicy 90 mm, na podłożu agarowym PDA (Plate Dextrose Agar). Całe podłoże na płytce inokulowano 300 μ l lub 100

μl zawiesiny zarodników fitopatogenu, o transmitancji 70%, następnie na środek płytki wykładano jałowy krążek bibuły o średnicy 5 mm, nasączony zawiesiną bakteryjnego biopreparatu zawierającego szczepy wyselekcjonowanych bakterii: *Bacillus subtilis* AF75AB2 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD. Płytki inkubowano w temperaturze 27°C, przez 5-7 dni i dokonywano pomiaru stref zahamowania wzrostu grzybni lub/i zahamowania zarodnikowania. Przeprowadzono też badania przechowalnicze, w ramach których okresowo w czasie 6 miesięcy przechowywania biopreparatu w różnych warunkach, w tym w temperaturze pokojowej, warunkach chłodniczych (4°C) oraz w podwyższonej temperaturze składowania (35°C), określano właściwości antagonistyczne biopreparatu na różnych nośnikach – płynnym (podłoże hodowlane), nierozpuszczalnym (dolomit mikronizowany) oraz rozpuszczalnym w wodzie (maltodekstryna). Uzyskane wyniki wskazują, że właściwości antagonistyczne opracowanych formułacji biopreparatu 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.8-Fig.12). Najlepsze właściwości antagonistyczne po 6 miesiącach przechowywania biopreparatu 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 mikroorganizmów w biopreparacie bakteryjnym

Liczebność mikroorganizmów w przygotowanym preparacie określono poprzez zliczenie i określenie ogólnej liczebności bakterii metodą wysiewu rozcieńczeń. Przygotowano szereg rozcieńczeń preparatu przeciwgrzybowego od 10^{-1} do 10^{-9} , z każdego rozcieńczenia wysiano po 0,1 ml na płytkę Petriego o średnicy 90 mm z podłożem PCA, rozprowadzono równomiernie po płytce po czym inkubowano w temperaturze 26°C, przez 72h. Wyrośnięte kolonie zliczono i wyznaczono ogólną liczebność bakterii (jtk/ml).

W preparacie po wytworzeniu wykazano ogólną liczebność bakterii na poziomie $>10^9$ jtk/ml biopreparatu bakteryjnego w postaci płynnej oraz $>10^9$ jtk/g biopreparatu 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 lub $>10^9$ jtk/ml biopreparatu w zależności od zastosowanych warunków przechowywania przez okres 6 miesięcy.

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

W celu określenia działania biopreparatu 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 $\frac{1}{2}$ objętości gleby i $\frac{1}{2}$ objętości torfu o granulacji 7-20mm. Biopreparat zaaplikowano na powierzchnię korzeni, a kombinację kontrolną stanowiły rośliny nietraktowane preparatem, rosnące w podłożu z dodatkiem 5 g suszonego obornika na doniczkę. W przykładzie wykonania biopreparat 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 biopreparatu bakteryjnego pozwoliła ocenić zmiany wskaźników bioróżnorodności, w tym efektywnej liczby gatunków (ENS) bakterii i grzybów w ryzosferze oraz korzeniach roślin traktowanych i nietraktowanych biopreparatem. Biopreparat spowodował zwiększenie bioróżnorodności bakterii w stosunku do kontroli oraz zachowanie bioróżnorodności grzybów na poziomie wariantu kontrolnego (Fig.13-Fig.14). Dokonano również analizy grup troficznych i gildii funkcjonalnych grzybów z wykorzystaniem bazy danych FunGuild. Wyniki te wykazały, że w korzeniu roślin traktowanych biopreparatem zaobserwowano obniżenie grupy patotrofów oraz trybów mieszanych: patotrofów-symbiotrofów i patotrofów-saprotrofów, a także odnotowano zwiększenie saprotrofów, symbiotrofów i grzybów prowadzących mieszany tryb troficzny saprotroficzno-symbiotroficzny (Fig.15). Dodatkowo wykazano, że w po aplikacji biopreparatu 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 biopreparatu. 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 ryzosferze i korzeniu roślin malin traktowanych biopreparatem, a utrzymanie podobnego poziomu wskaźników bioróżnorodności na podobnym poziomie, przy czym stwierdzono obniżenie niektórych fitopatogenicznych grup grzybów (Fig.15-Fig.16, Fig.20-Fig.22).

Zaletą biopreparatu 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 ryzosfery zdrowych roślin, a tym samym przyjazny dla środowiska. Preparat dedykowany jest do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby i mikrobiomu roślin owoców miękkich, przy jednoczesnej kontroli fitopatogenów występujących w tych uprawach.

Przykład 5. Działanie biopreparatu 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 bakteryjnego biopreparatu, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD na plonowanie roślin oraz występowanie fitopatogenów przeprowadzono doświadczenia polowe, w których do technologii uprawy został wprowadzony biopreparat bakteryjny, 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 biopreparatu bakteryjnego, 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 biopreparatu bakteryjnego. Uzyskane wyniki wskazują, że gatunki i odmiany roślin różnie reagowały na testowane technologie uprawy, w tym dodatek biopreparatu bakteryjnego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii. W obiekcie nawadnianym, w wariantach, w których wprowadzono dodatek opracowanego biopreparatu

bakteryjnego, 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 Vibrant w obiekcie nienawadnianym, w wariacie, w którym zastosowano dodatek biopreparatu bakteriowego, zmniejszyło się porażenie roślin skórzastą zgnilizną owoców. Odmiana Honeoye zareagowała natomiast zmniejszeniem porażenia antraknozą. 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 biopreparat bakteriowy. Ogólny wskaźnik różnorodności mikrobiologicznej gleby uległ podwyższeniu w wariacie, w którym włączono aplikację opracowanego biopreparatu bakteriowego.

Przykład 6. Sposób otrzymywania biopreparatu bakteriowego – formuacja płynna

Do otrzymania bakteriowego biopreparatu do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności gleby i/lub kontrolowania kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich, zastosowano 2 wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, niewykluczające swojego działania następujące szczepy bakterii: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 2, na liście sekwencji, dla których prowadzono osobne hodowle, które mieszano w równych proporcjach, w celu uzyskania kompozycji zawierającej wyizolowane szczepy saprofitycznych bakterii ryzosfery i/lub biopreparatu, 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 biopreparatu było zoptymalizowane podłoże zawierające: 6,6 g/L Na₂HPO₄, 3g/L KH₂PO₄, 1g/L NH₄Cl, 0,5g/L NaCl, serwatkę kwaśną neutralizowaną w ilości 20 g/L, CaCl₂ w ilości 0,022 g/L, MgSO₄ w ilości 0,18g/L, FeCl₂ w ilości 12,9 mg oraz 10 ml roztworu mikroelementów zawierającego: 0,5mM MnCl₂*4 H₂O, 1,2 mM ZnCl₂, 0,27mM CuCl₂*2 H₂O, 0,23 mM CoCl₂*6 H₂O, 0,23 mM Na₂MoO₄*2 H₂O. Po otrzymaniu miana hodowli namnażającej przeprowadzono etap indukcji

przetrwalnikiowania podwyższając temperaturę hodowli do 40°C. Po 48 godzinach hodowli hodowle pasteryzowano poprzez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut. Tak przygotowana zawiesina przetrwalników była głównym z komponentów biopreparatu.

Do hodowli bakteryjnej (zawiesiny przetrwalników) dodawano płynny wyciąg z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz płynne kwasy humusowe. Po połączeniu składników przygotowany preparat stabilizowano poprzez zmianę odczynu, obniżając pH preparatu za pomocą kwasu mlekowego do 4,0-4,5.

Przykład 7. Sposób otrzymywania biopreparatu bakteryjnego – formulacja sucha nierozpuszczalna w wodzie suszona rozpyłowo

Sposób prowadzono jak w Przykładzie 6., z tym że po zakończeniu hodowli, dla uzyskania nierozpuszczalnej w wodzie formulacji 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 ekstraktami pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz płynnymi kwasami humusowymi zastosowano dolomit mikronizowany z dodatkiem suchych ekstraktów pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz suchych kwasów humusowych.

Przykład 8. Sposób otrzymywania biopreparatu bakteryjnego – nierozpuszczalna w wodzie formulacja sucha zawierająca liofilizowane szczepy bakterii

Otrzymany sposobem opisanym w Przykładzie 7. biopreparat do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności gleby i/lub kontrolowania kluczowych patogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich posiada analogiczny skład jak wskazano w Przykładzie 7, z tym, że zamiast suszenia rozpyłowego hodowle bakteryjne poddaje się liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów.

Przykład 9. Sposób otrzymywania biopreparatu bakteryjnego – formulacja sucha rozpuszczalna w wodzie

Sposób otrzymywania biopreparatu bakteryjnego prowadzono jak w Przykładzie 7., z tym że hodowle poddano suszeniu rozpyłowemu na maltodekstrynie zamiast na serwatce w proszku, dla uzyskania rozpuszczalnej formulacji suchej do oprysku lub zraszania. Jako

nośnik wysuszonych na maltodekstrynie bakterii zamiast dolomitu mikronizowanego z dodatkiem suchych ekstraktów pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz suchych kwasów humusowych zastosowano maltodekstrynę z dodatkiem suchych ekstraktów pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz suchych kwasów humusowych.

Przykład 10. Sposób otrzymywania biopreparatu bakteryjnego – rozpuszczalna w wodzie formacja sucha zawierająca liofilizowane szczepy bakterii

Biopreparat 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.

ZASTRZEŻENIA PATENTOWE

1. Sposób otrzymywania bakteryjnego biopreparatu 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*, **znamienny tym**, że stosuje się:

- dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – 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 i nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej i rozpuszczalnej w wodzie;
- dodatek ekstraktów roślinnych z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz dodatek kwasów humusowych jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

2. Sposób otrzymywania biopreparatu 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 biopreparatu według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się inokulum o transmitancji 90%.

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

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

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

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

8. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z zastrz. 2-7, **znamienny tym**, że po otrzymaniu miana hodowli namnażającej nie mniejszego niż 10^9 jtk/ml przeprowadza się etap indukcji przetrwalnikowania, korzystnie podwyższając temperaturę hodowli do 40°C 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 biopreparatu.
9. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z zastrz. 2-8, **znamienny tym**, że po zakończeniu hodowli, dodaje się jako komponent nośnika ekstrakty roślinne z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz kwasy humusowe, które w zależności od formulacji biopreparatu mają postać płynną albo suchą.
10. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że postać płynną otrzymuje się poprzez połączenie 390-410 ml zawiesiny przetrwalników każdego szczepu bakteryjnego: *Bacillus subtilis* AF75AB2 i *Bacillus* sp. Sp115AD o nr 1 i 2 na liście sekwencji i po 45-55 ml każdego z ekstraktów z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz 45-55 ml płynnych kwasów humusowych.
11. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że otrzymaną postać płynną poddaje się stabilizacji zabezpieczającej przed rozwojem przetrwalników poprzez obniżenie odczynu preparatu do $\text{pH}=4,0-4,5$.
12. Sposób otrzymywania biopreparatu według zastrz. 11, **znamienny tym**, że stosuje się kwas mlekowy.
13. Sposób otrzymywania biopreparatu 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 wysuszone albo liofilizowane bakterie o koncentracji nie mniejszej niż 10^{11} jtk/g, a wysuszone albo liofilizowane bakterie dodaje się w równych ilościach do uzyskania biopreparatu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g.
14. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z zastrz. 1-9, albo 13, **znamienny tym**, że do postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się suche ekstrakty z pokrzywy, skrzypu, nagietka oraz suche kwasy humusowe w ilości odpowiednio 0,045-0,055 g/kg; 0,045-0,055 g/kg; 0,12-0,13 g/kg oraz 0,55-0,65 g/kg

biopreparatu, a jako nośnik wszystkich komponentów biopreparatu stosuje się dolomit mikronizowany, stanowiący dopełnienie do 1 kg biopreparatu.

15. Sposób otrzymywania biopreparatu 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 biopreparatu, stosuje się maltodekstrynę, a wysuszone/liofilizowane bakterie o koncentracji nie mniejszej niż 10^{11} jtk/g dodaje się w równych ilościach do uzyskania biopreparatu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g.

16. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z zastrz. 1-9, albo 15, **znamienny tym**, że do postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się suche ekstrakty z pokrzywy, skrzypu, nagietka oraz suche kwasy humusowe w ilości odpowiednio 0,045-0,055 g/kg; 0,045-0,055 g/kg; 0,12-0,13 g/kg oraz 0,55-0,65 g/kg biopreparatu, a maltodekstryna jako krioprotektant bakterii i nośnik właściwy stanowi dopełnienie do 1 kg biopreparatu.

17. Bakteryjny biopreparat do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności gleby i/lub kontrolowania patogenów *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 subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, nośnik właściwy w postaci podłoża hodowlanego dla postaci płynnej biopreparatu albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie oraz zawiera dodatek ekstraktów roślinnych z pokrzywy, skrzypu i nagietka i dodatek kwasów humusowych jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego, 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. Bakteryjny biopreparat według zastrz. 17, **znamienny tym**, że zawiera szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, w równym stosunku wagowym dla postaci suchej albo w równym stosunku objętościowym dla postaci płynnej biopreparatu.

19. Bakteryjny biopreparat według zastrz. 17 albo 18, **znamienny tym**, że izolaty bakteryjne wyhodowane są na podłożu namnażającym z serwatką w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.
20. Bakteryjny biopreparat 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. Bakteryjny biopreparat według dowolnego zastrz. 17 - 20, **znamienny tym**, że jego postać płynna zawiera w 1 litrze po 45-55 ml dodatku każdego z płynnych ekstraktów z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz płynnych kwasów humusowych.
22. Bakteryjny biopreparat 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. Bakteryjny biopreparat według zastrz. 17, 18, 19 albo 22, **znamienny tym**, że jego postać sucha rozpuszczalna albo nierozpuszczalna w wodzie zawiera dodatek suchych ekstraktów z: pokrzywy w ilości 0,045-0,055 g/kg, skrzypu w ilości 0,045-0,055 g/kg i nagietka w ilości 0,12-0,13 g/kg oraz suchych kwasów humusowych w **ilości** 0,55-0,65 g/kg.
24. Bakteryjny biopreparat 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. Bakteryjny biopreparat 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.

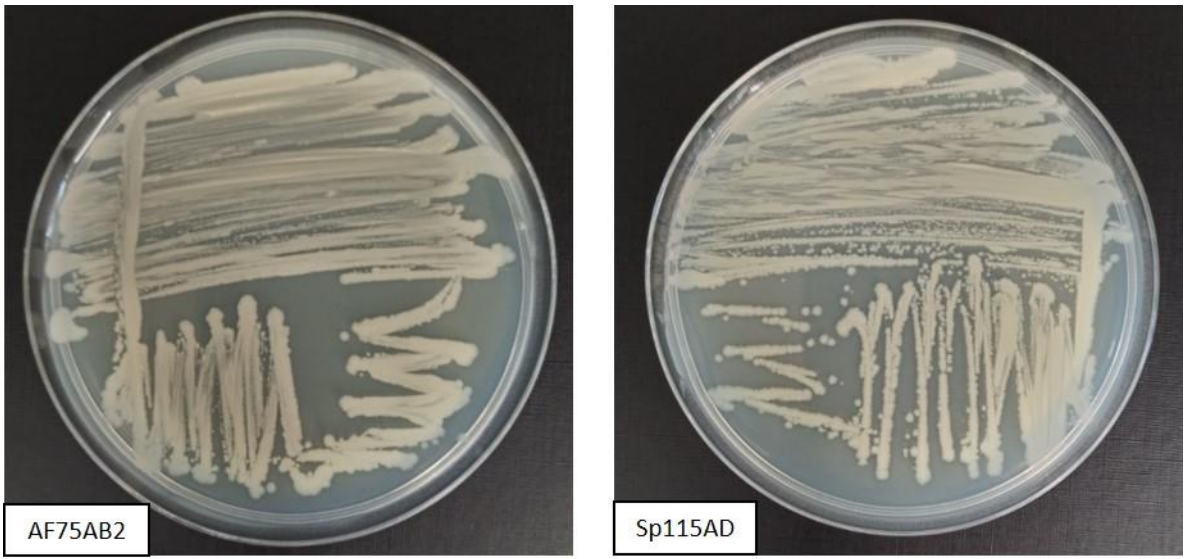


Fig. 1

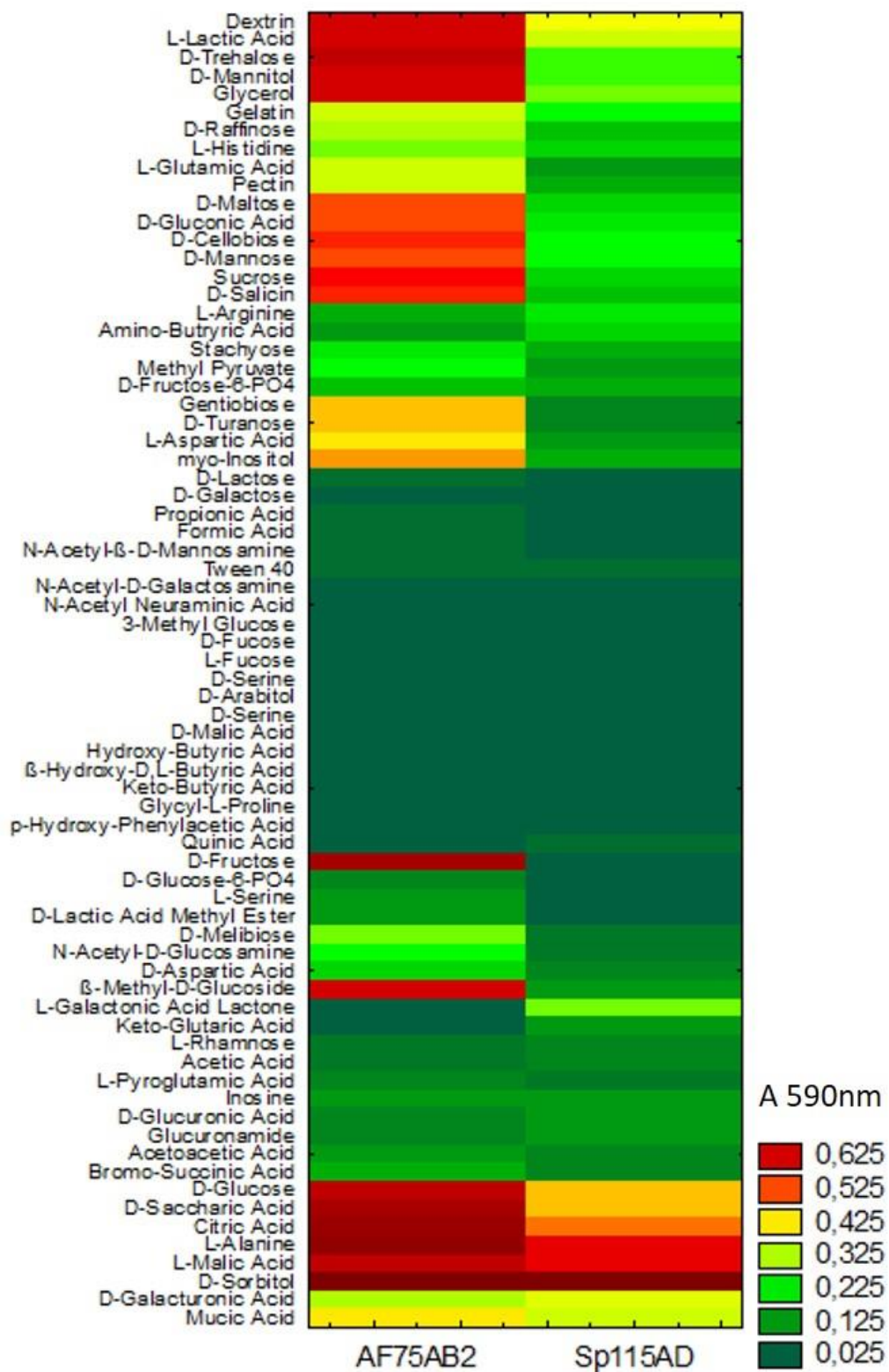


Fig. 2

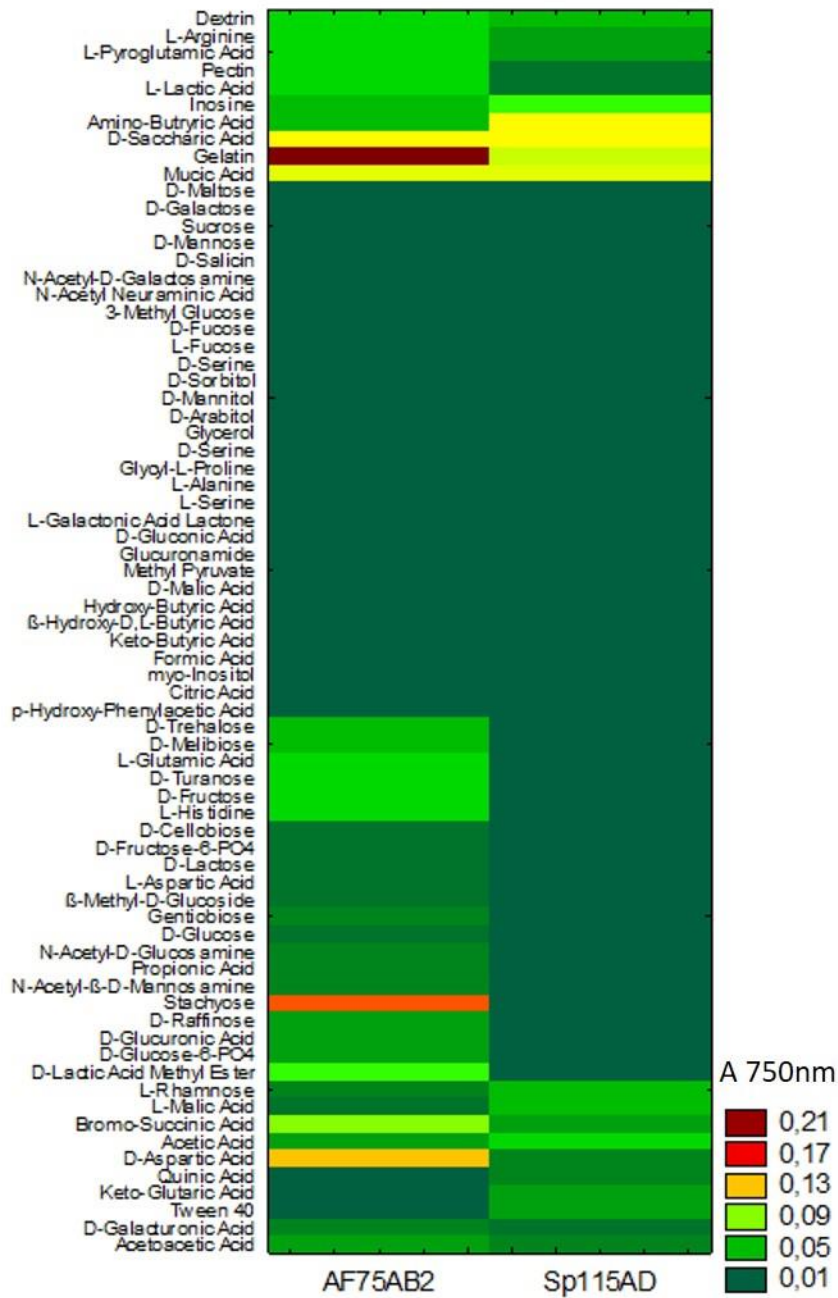


Fig. 3

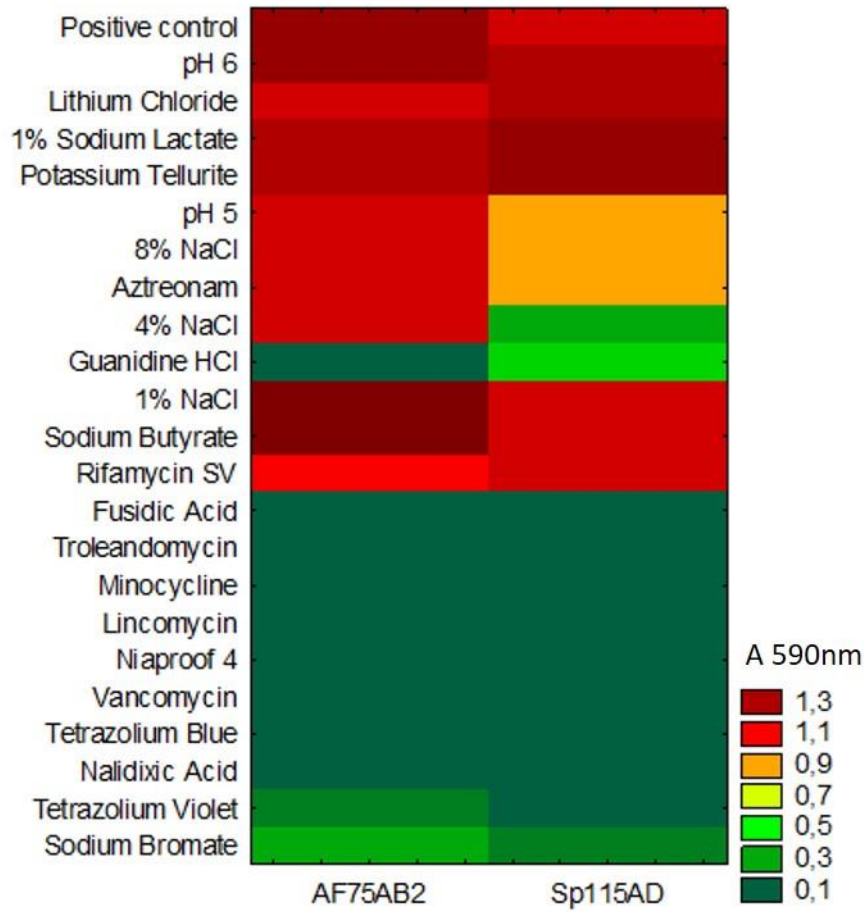


Fig. 4

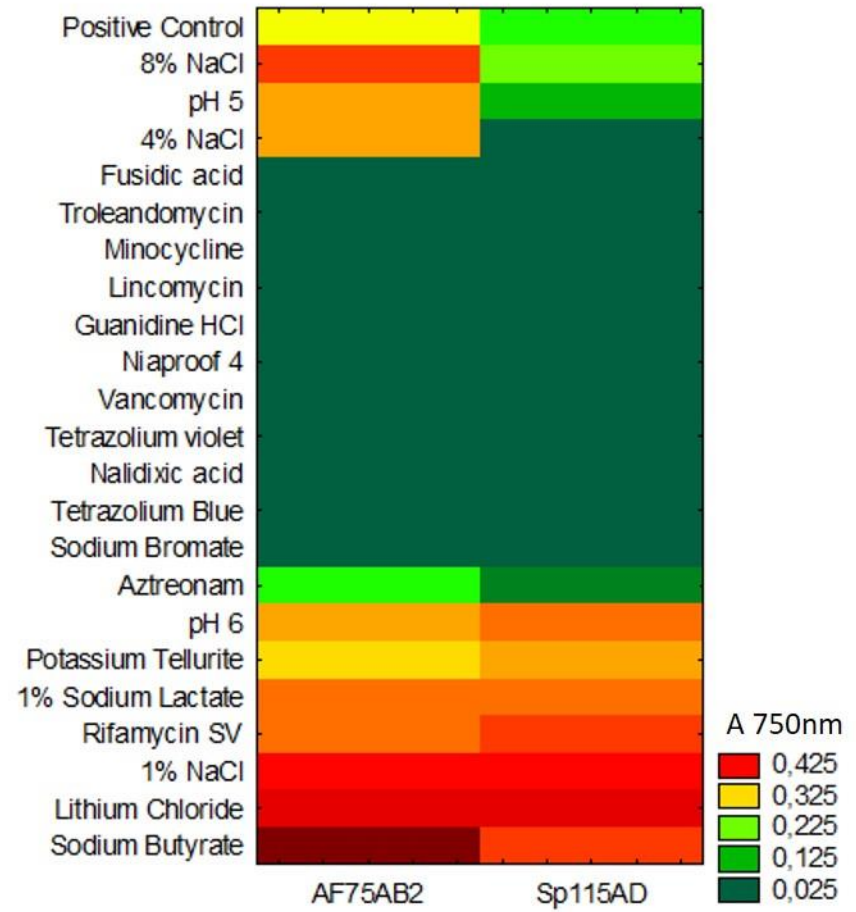


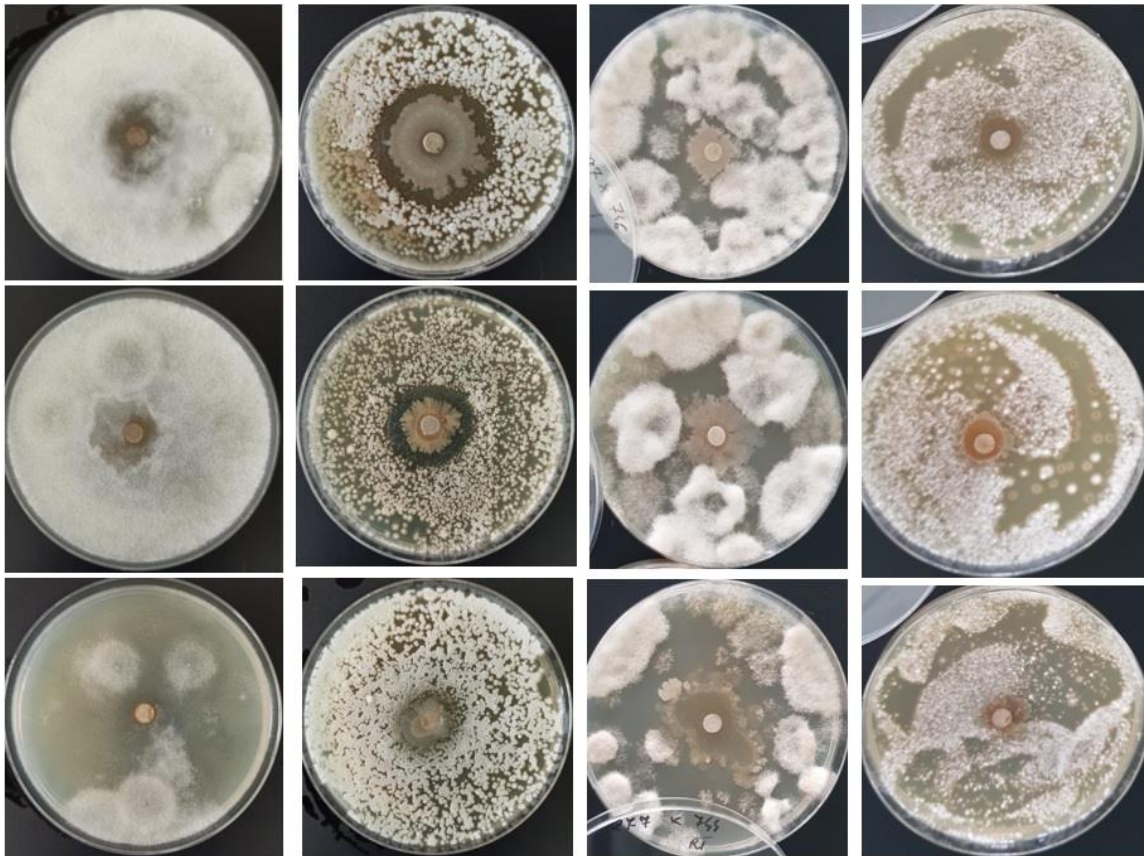
Fig. 5



Fig. 6

Aktywność enzymatyczna	Zastosowany substrat	AF75AB2	Sp115AD
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-fenylalanino-2-naftylamid	-	-
Kwaśna fosfataza	2-naftylo-fosforan	++	++
Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI	Naftylo-AS-BI-fosforan	+++	+++
α - galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-galaktopiranosyd	++	-
β - galaktozydaza	2-naftylo- β D-galaktopiranosyd	-	-
β - glukuronidaza	Naftylo-AS-BI- β D- glukuronid	-	-
α - glukozydaza	2- naftylo- α D- glukopiranozyd	+++	++
β - glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β D-galaktopiranozyd	+++	++
N-acetylo- β -glukozaminidaza	1- naftylo-N- acetyl- β D-glukozaminid	-	-
α - mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-mannopiranozyd	-	-
α - fukozydaza	2- naftylo- α L- fukopiranozyd	-	-

Fig. 7



Phytophthora spp.
G408/18

Colletotrichum spp.
G171/18

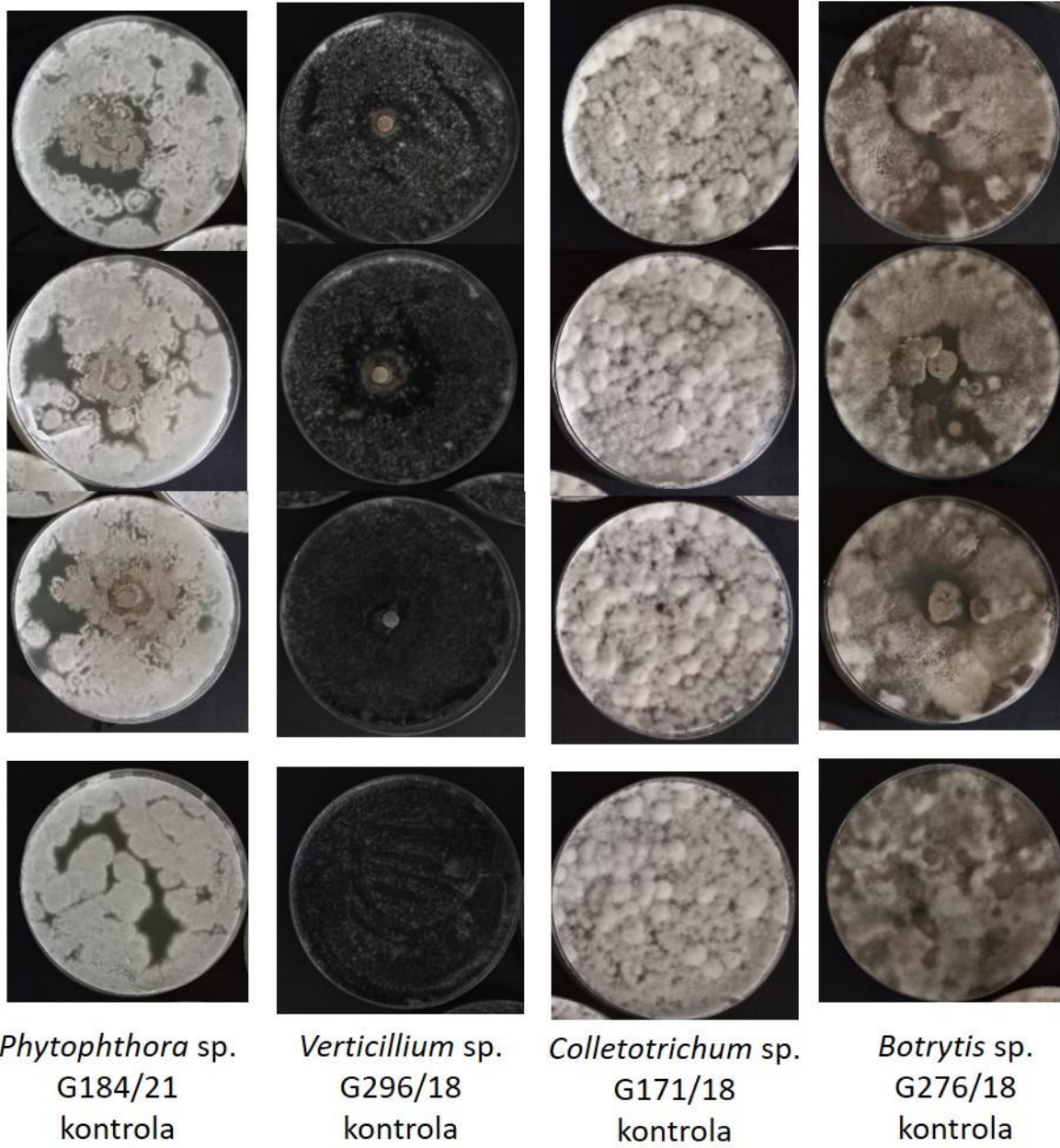
Botrytis spp.
G277/18

Verticillium spp.
G296/18

Fig. 8

Fitopatogeny	Strefa zahamowania wzrostu (mm) ±odchylenie standardowe – postać płynna	Strefa zahamowania wzrostu (mm) ±odchylenie standardowe – postać sucha nierozpuszczalna w wodzie	Strefa zahamowania wzrostu (mm) ±odchylenie standardowe – postać sucha rozpuszczalna w wodzie
<i>Colletotrichum</i> sp. G171/18	35,60 ±8,25	15,00 ±5,00	18,00 ±14,70
<i>Botrytis</i> sp. G277/18 / G276/18	24,00 ±3,55	27,30 ±2,30	32,00 ±11,20
<i>Phytophthora</i> sp. G408/18 / 184/21	16,40 ±6,61	22,00 ±8,00	58,70 ±28,90
<i>Verticillium</i> sp. G297/18 / G296/18	13,50 ±2,00	16,70 ±2,90	46,60 ±24,40

Fig. 9

**Fig. 10**

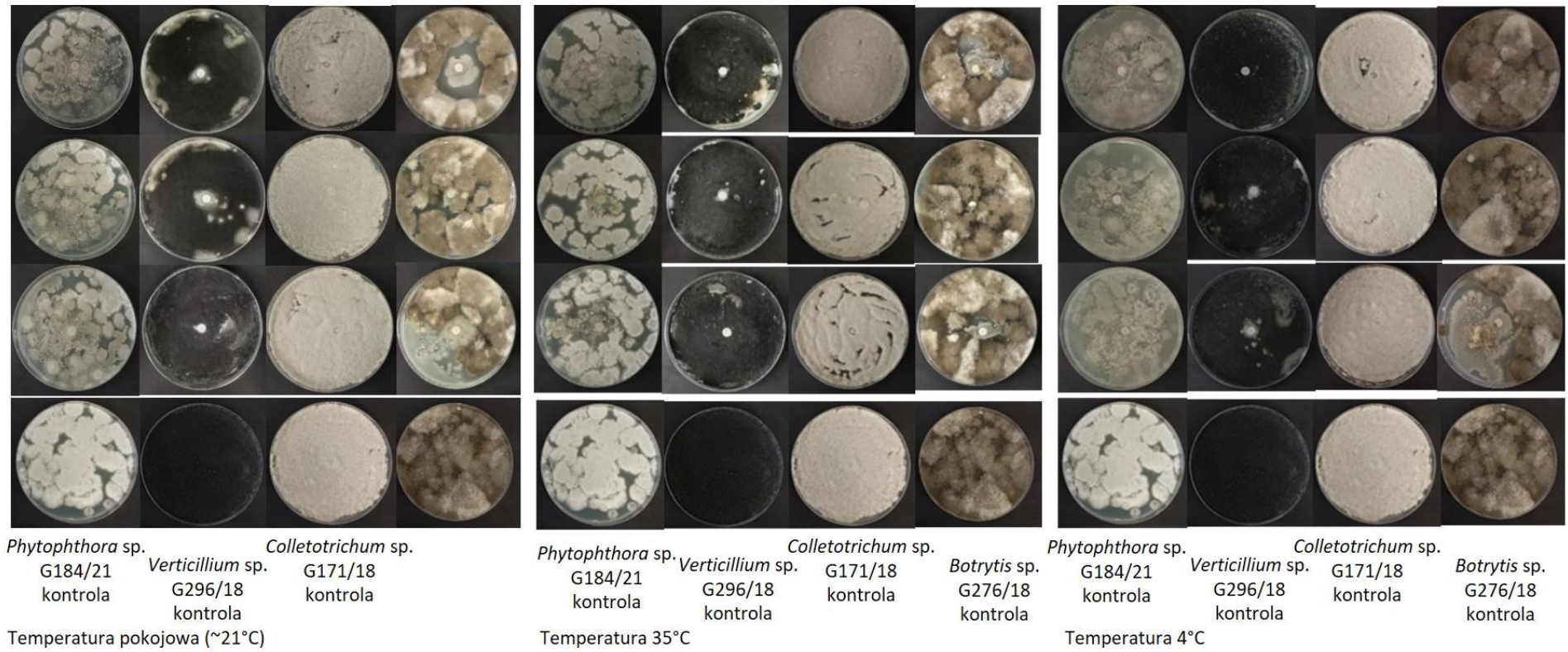


Fig. 11

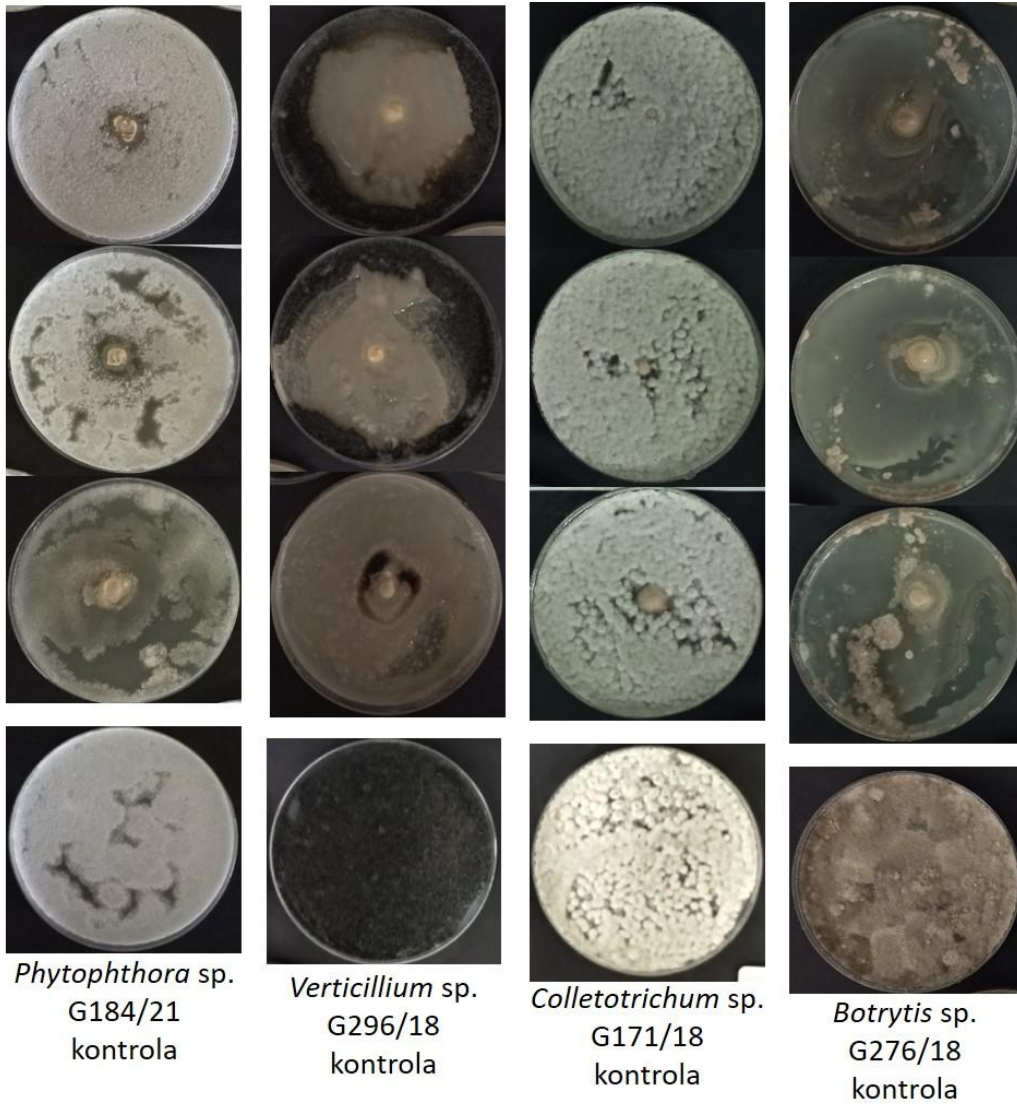


Fig. 12

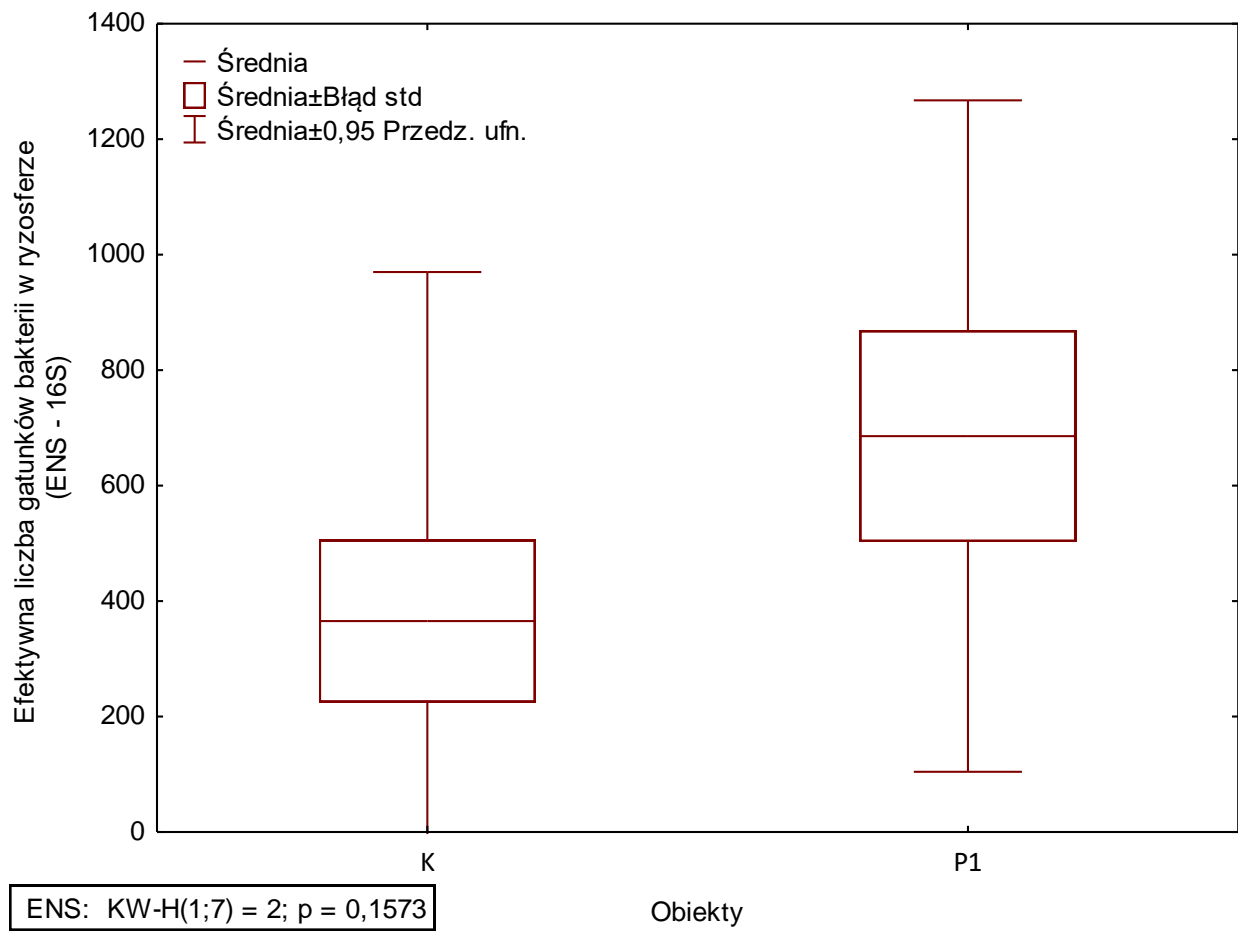


Fig. 13

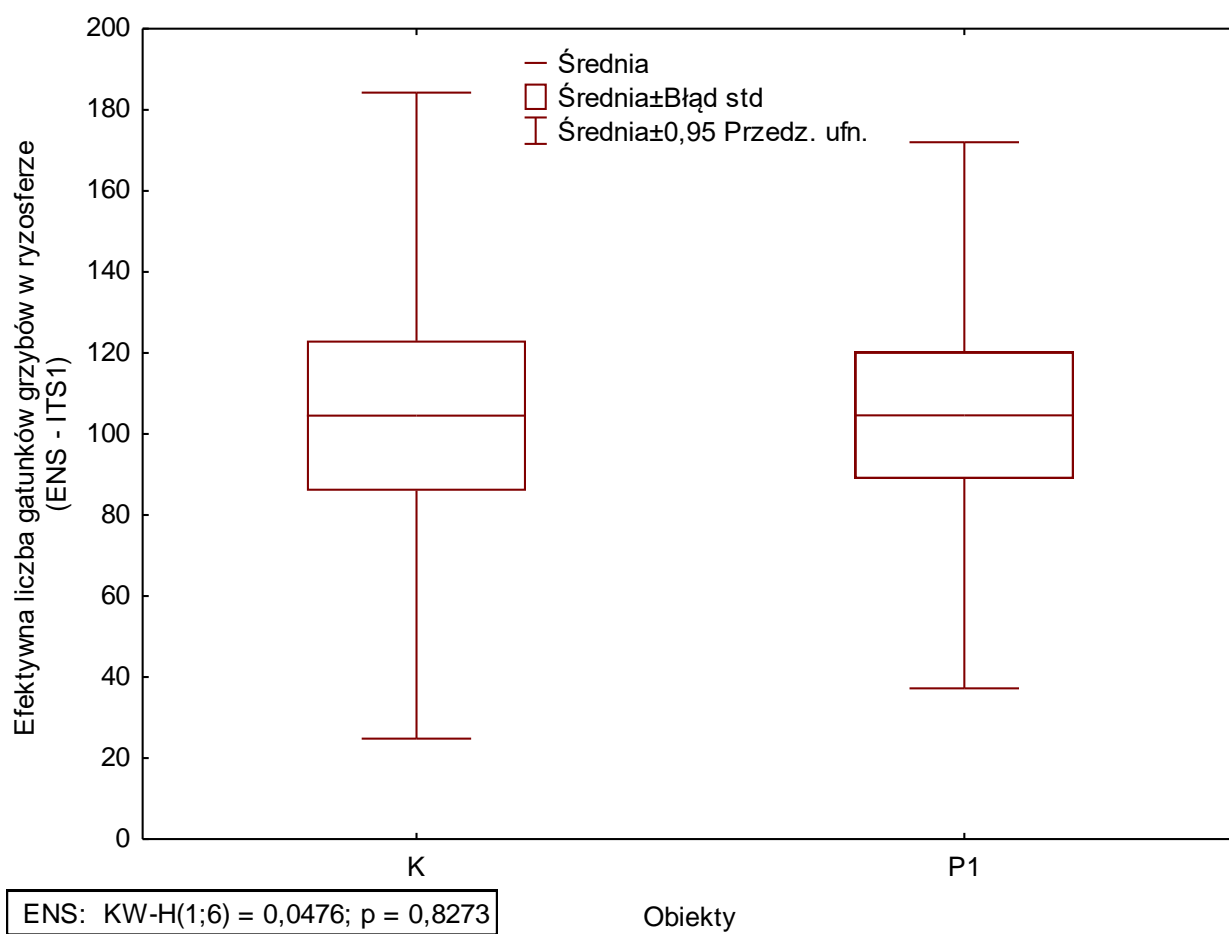


Fig. 14

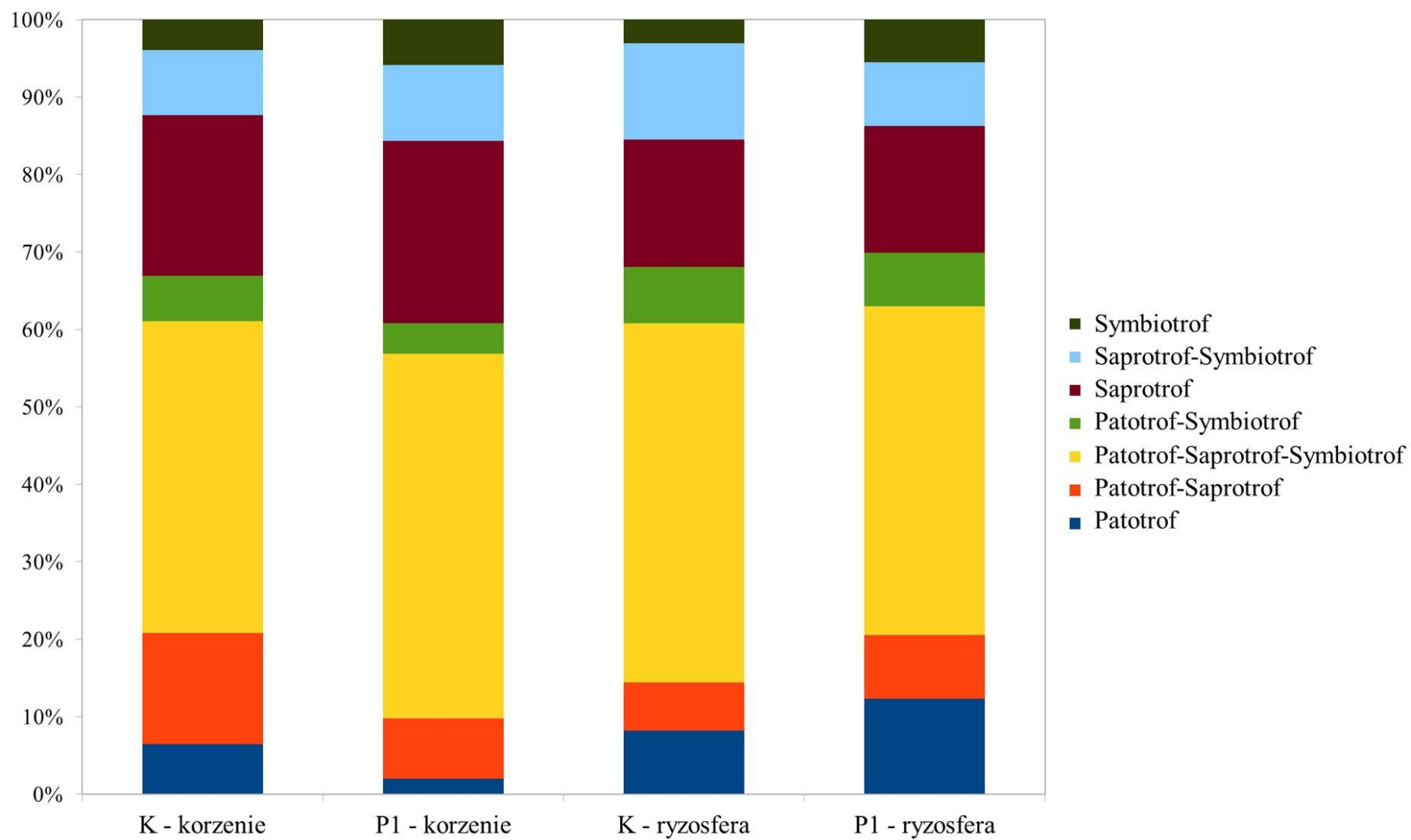


Fig. 15

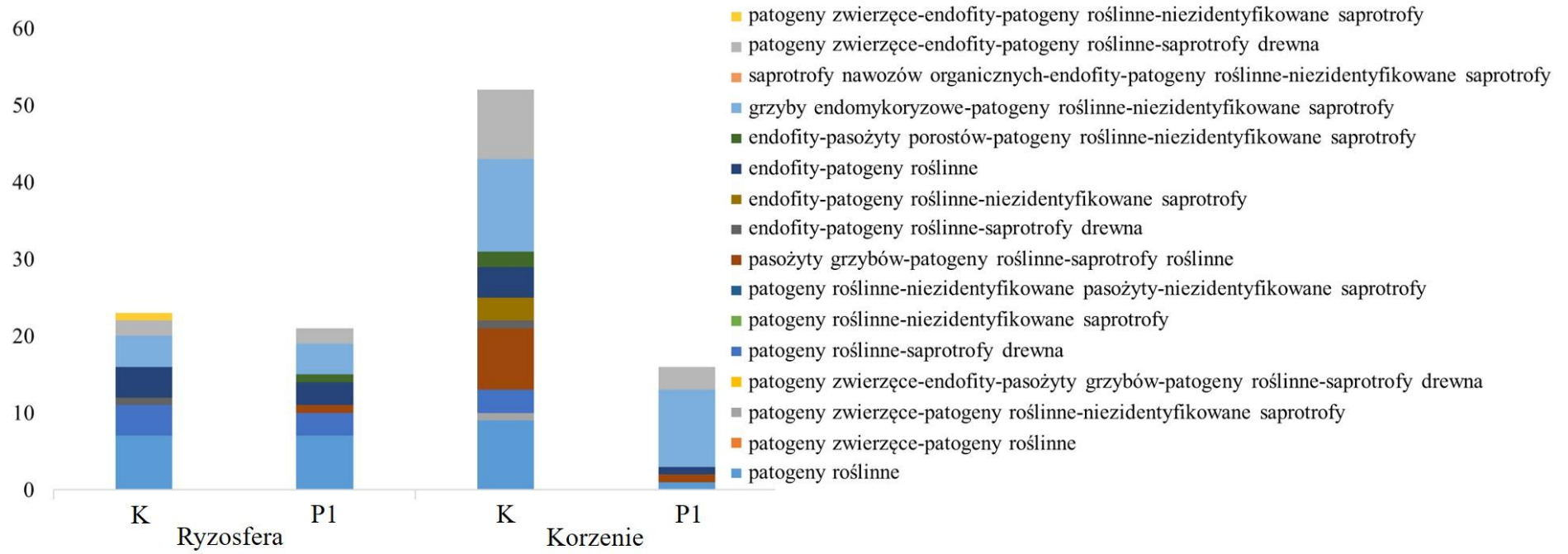


Fig. 16

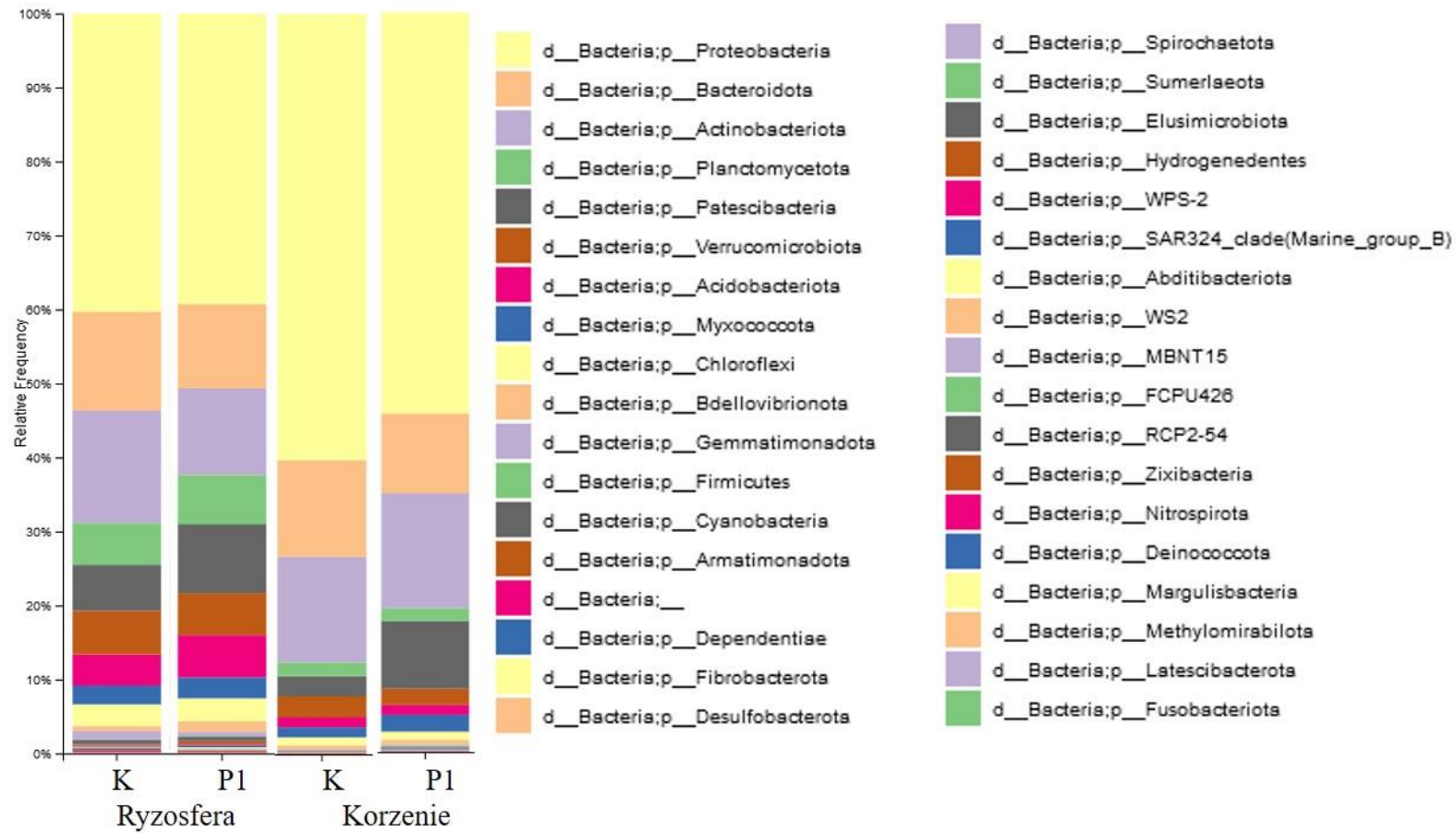


Fig. 17

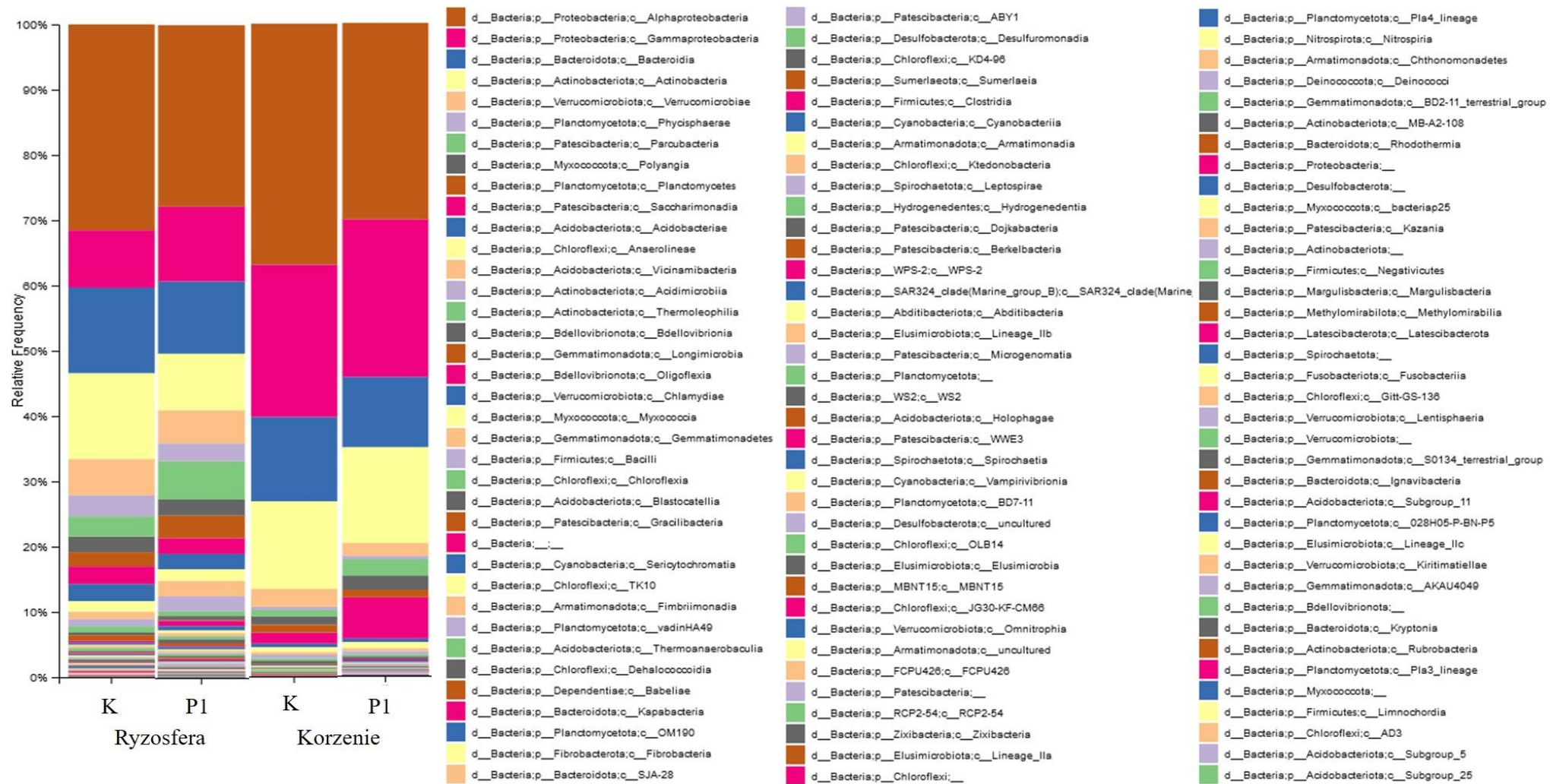


Fig. 18

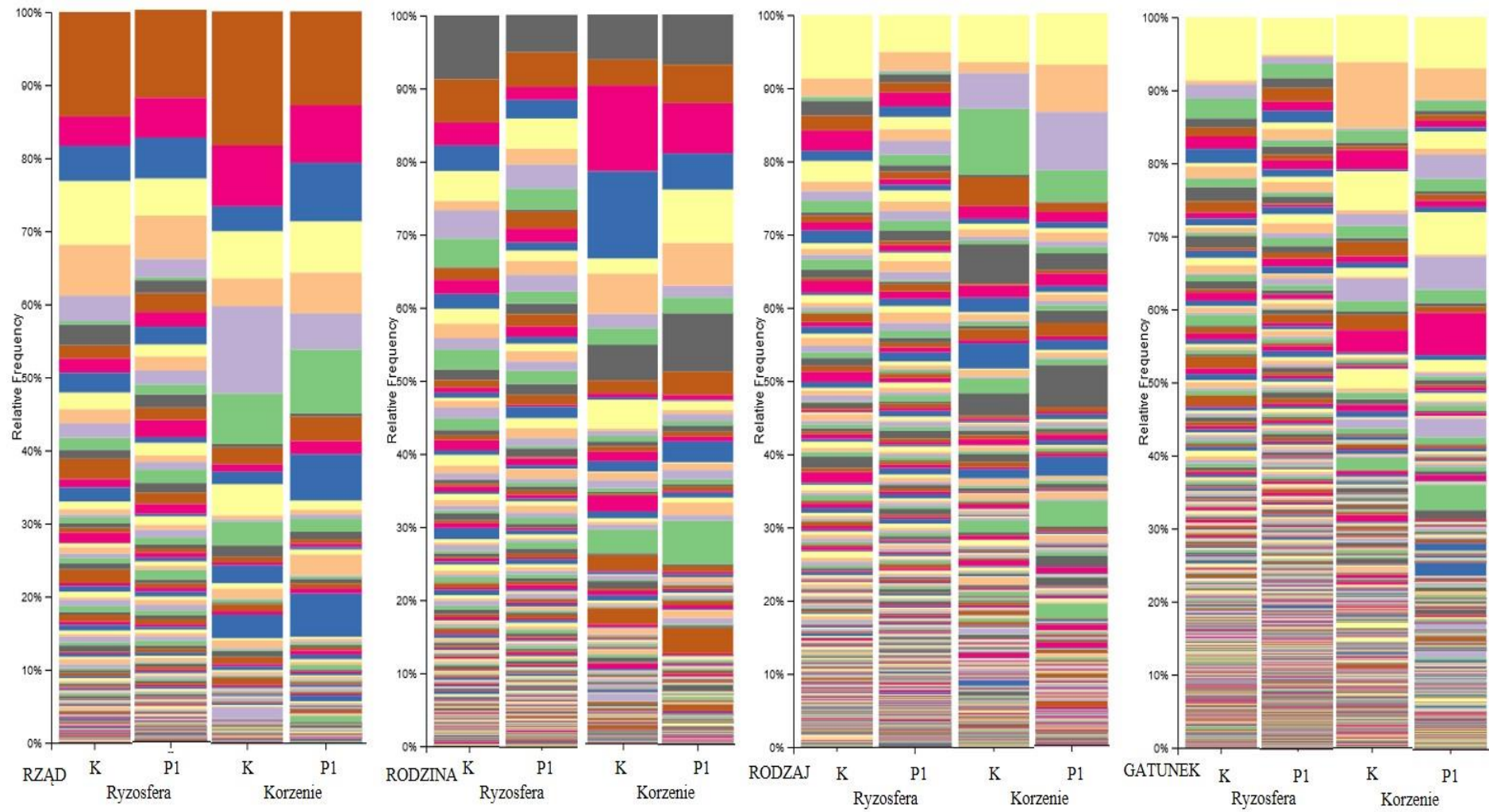


Fig. 19

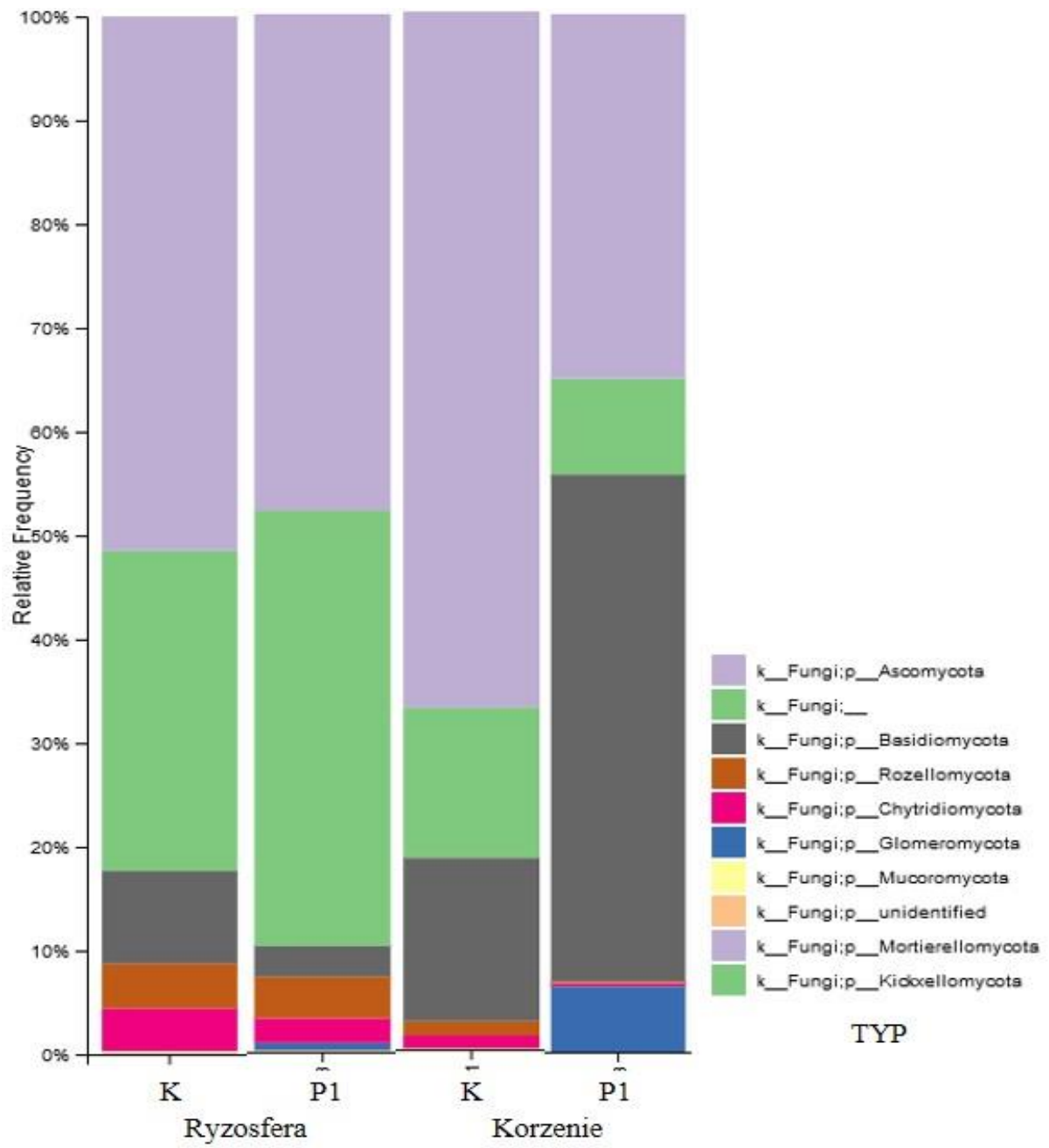


Fig. 20

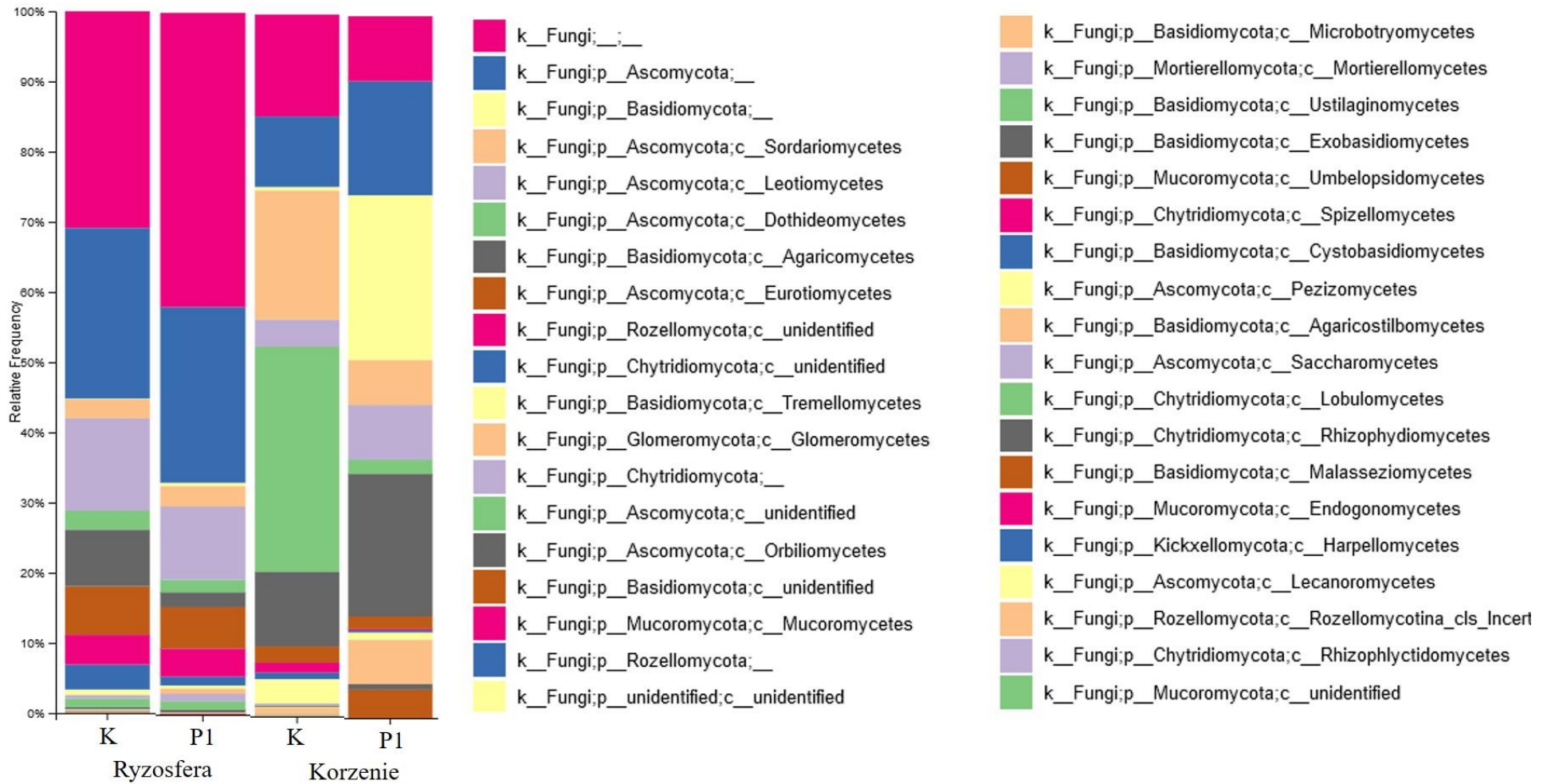


Fig. 21

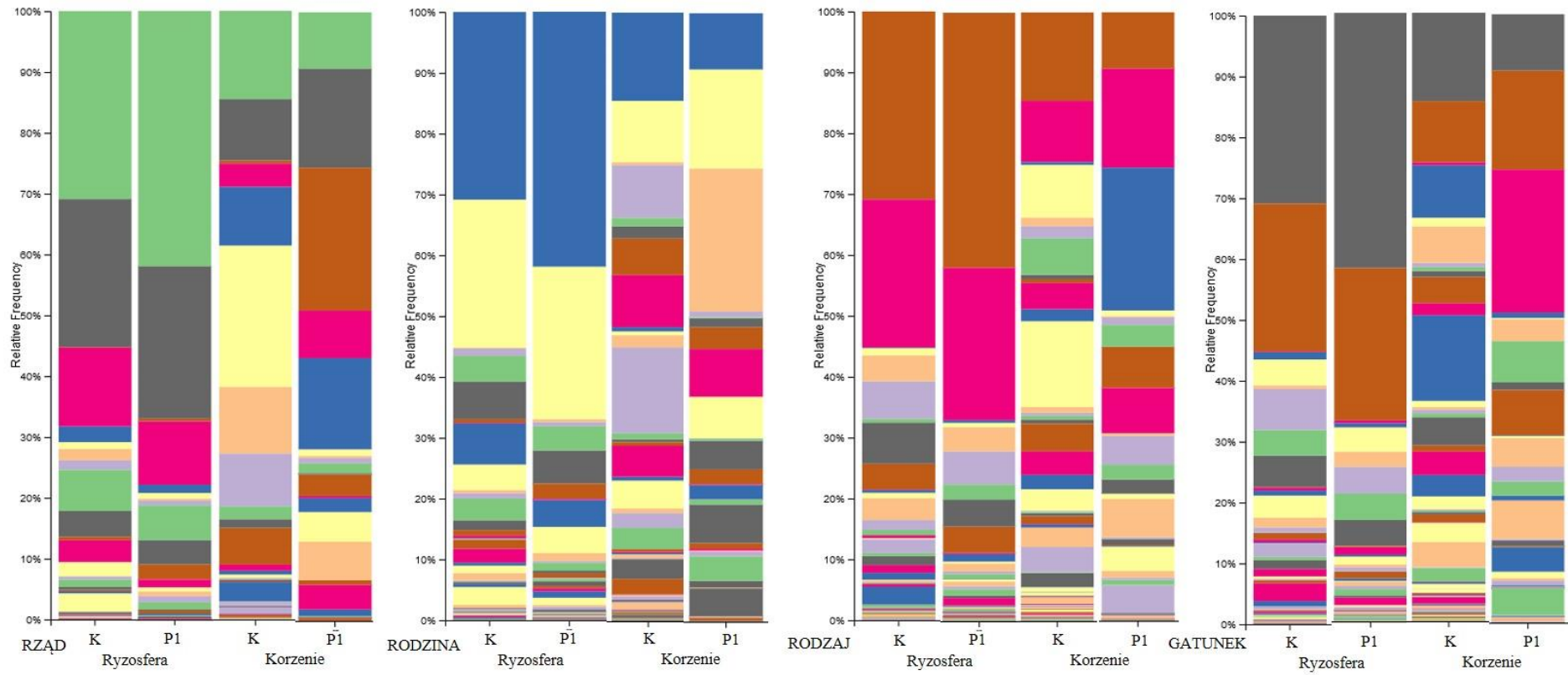


Fig. 22

SKRÓT OPISU

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania bakteryjnego biopreparatu 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*, **polegający na tym, że** stosuje się: dwa wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1 oraz *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 2 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami przygotowanym na wodzie, zawieszono 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 i nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej i rozpuszczalnej w wodzie oraz dodatek ekstraktów roślinnych z pokrzywy, skrzypu i nagietka oraz dodatek kwasów humusowych jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego. Przedmiotem wynalazku jest ponadto bakteryjny biopreparat do utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności gleby i/lub kontrolowania patogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazujący cechy biostymulacyjnego działania na rośliny.

(25 zastrzeżeń)