

BacilRoots

Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego i nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania sadzonek, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów w uprawie owoców miękkich

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego i nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania sadzonek, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów w uprawie owoców miękkich. Preparat zawiera szczepy bakteryjne *Bacillus* spp., a także składniki nośnika, w tym kwasy humusowe i inne dodatki. Preparat wpływa na poprawę parametrów jakościowych owoców miękkich i wykazuje również cechy biostymulacji roślin.

Badania nad rozwojem ekologicznych technik uprawy roślin sadowniczych koncentrują się m.in. na analizie różnorodności biologicznej mikroorganizmów w środowisku glebowym i zmianach intensywności procesów zachodzących w ryzosferze czy stosowaniu bioproduktów w celu ochrony roślin przed patogenami grzybowymi i szkodnikami (Frąc, M., Hannula, E.S., Belka, M., Salles, J.F., Jedryczka, M., 2022. *Soil mycobiome in sustainable agriculture. Front. Microbiol. 13:1033824. 10.3389/fmicb.2022.1033824*). W rolnictwie ekologicznym dopuszcza się stosowanie nawozów naturalnych i substancji poprawiających właściwości gleby. Są to produkty nieorganiczne i organiczne, które są przyjazne dla środowiska i ludzi (EASAC, 2022. *Regenerative agriculture in Europe: A critical analysis of contributions to European Union Farm to Fork and Biodiversity Strategies. European Academies Science Advisory Council, policy report 44, April 2022, pp. 1-70, ISBN: 978-3-8047-4372-4, www.easac.eu*). Na rynku europejskim dostępne są nawozy organiczne oraz substancje do poprawy właściwości gleb produkowane na bazie ekstraktów roślinnych oraz kompostu. Bioprodukty na bazie wyciągów z roślin zawierają coraz częściej dodatek pożytecznych mikroorganizmów, które wykorzystywane są również do zwalczania chorób i szkodników (Pylak M., Oszust K., Frąc M.

(2019). *Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. Rev Environ Sci Biotechnol (2019) 18:597–616, <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09500-5>*.

Sytuacja rolnictwa ekologicznego zmienia się dynamicznie w Polsce, Europie i na świecie, jednakże pomimo trudności wielu rolników wciąż przekształca gospodarstwa na system uprawy ekologicznej, a tendencja wzrostowa tego typu upraw obserwowana i wspierana jest również przez Unię Europejską (*European Commission. Communication from the commission to the European Parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions. A Farm to Fork Strategy for a Fair, Healthy and Environmentally-friendly Food System, 2020, ISBN 9789896540821, European Commission, Brussels, Belgium*). W latach 2003-2013 liczba gospodarstw ekologicznych w Polsce wzrosła ponad 11-krotnie z 2 286 w 2003 roku do prawie 26 598 w 2013 roku, co więcej, wielkość gospodarstw ekologicznych również systematycznie wzrasta (*FAOSTAT, GUS*). Jednak w Polsce niewiele jest naturalnych nawozów i substancji ochronnych na bazie mikroorganizmów, a w szczególności z zawartością rodzimych szczepów bakteryjnych, nadających się do uprawy ekologicznej i nawożenia roślin sadowniczych, w tym w zwłaszcza dedykowanych uprawom owoców miękkich. **Ponadto, polskie** rolnictwo stoi przed wyzwaniem opracowania strategii zrównoważonego rozwoju, które chronią nieodnawialne zasoby naturalne, do których należy również gleba. W ostatnich dziesięcioleciach wiele uwagi poświęcono łagodzeniu erozji gleby poprzez fizyczne środki ochrony i dostarczanie dodatkowych składników odżywczych i wody w celu zaspokojenia potrzeb upraw. Mniej uwagi poświęcono glebie jako dynamicznemu żywemu organizmowi, chociaż jej stan ma zasadnicze znaczenie dla produkcji żywności oraz dla globalnej równowagi i funkcjonowania ekosystemu. Jakość i zdrowotność gleby determinują rozwój zrównoważonego rolnictwa, utrzymanie jakości środowiska i w konsekwencji wspieranie zdrowia roślin, zwierząt i ludzi (*Frąc, M., Hannula, S.E., Belka, M., Jędryczka, M., 2018. Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. Front. Microbiol. 9:707. doi: 10.3389/fmicb.2018.00707*). Praktyki rolnicze, które wykorzystują duże ilości środków zewnętrznych, takich jak nawozy nieorganiczne, pestycydy i inne sztuczne środki mogą przewyżżyć specyficzne ograniczenia glebowe w produkcji roślinnej, jednak coraz częściej obserwowany jest niekorzystny **wpływ** tych dodatków na środowisko, co prowadzi do ciągłej degradacji środowiska, w tym utraty różnorodności biologicznej gleby. Dlatego rolnictwo zrównoważone, w tym ekologiczne jest obecnie jedną z najszybciej rozwijających się gałęzi rolnictwa na świecie, w szczególności w Unii Europejskiej (*EASAC, 2022. Regenerative agriculture in Europe: A critical analysis of contributions to European Union*

Farm to Fork and Biodiversity Strategies. European Academies Science Advisory Council, policy report 44, April 2022, pp. 1-70, ISBN: 978-3-8047-4372-4, www.easac.eu).

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

Rodzaj *Bacillus* jest intensywnie badaną grupą bakterii o dużym potencjale wykorzystania w rolnictwie, głównie ze względu na to, że mikroorganizmy należące do tego rodzaju występują niemal we wszystkich typach gleb, charakteryzują się dużą tolerancją na wysokie temperatury, szybko się namnażają w płynnych podłożach hodowlanych i należą do bakterii przetrwalnikujących.

W obecnym stanie wiedzy opisano, że wśród bakterii z rodzaju *Bacillus* występują szczepy, które charakteryzują się wysoką aktywnością metaboliczną, przydatną w przekształcaniu materii organicznej, a także 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 zastosowań rolniczych.

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

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

Znane jest również wykorzystanie w ochronie roślin szczepów *Bacillus methylotrophicus* XT1 oraz XT2 o aktywności antagonistycznej w stosunku do *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* i *Phytophthora cactorum* (Bejar Luque M.V., Llamas Company, Inmaculada, Ruiz Garcia C., Quesada Arroquia E., *Use of Bacillus methylotrophicus as a*

stimulant of plant growth and biological control means, and isolates of said species, 2016, CA Patent: CA 2991678 A1). Szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis* zostały także wykorzystane jako komponenty preparatu nicieniobójczego (*Abilio A., Knap I., De Freitas Zambelli L.S., Kompozycja nicieniobójcza zawierająca Bacillus subtilis i Bacillus licheniformis, EP2603086*).

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

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

Brak jest też doniesień literaturowych i patentów odnośnie łącznego zastosowania mikroorganizmów na nośnikach złożonych z kwasów humusowych i/lub wywaru melasowego i/lub mielonej gorczycy i/lub gumy ksantanowej i/lub olejku goździkowego i/lub dolomitu mikronizowanego i/lub maltodekstryny i/lub serwatki w proszku, w zależności od formy aplikacji (płynnej lub suchej lub żelowej) nawozowego produktu mikrobiologicznego.

Celem wynalazku jest zatem opracowanie nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania sadzonek, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, pozwalającego jednocześnie na kontrolę fitopatogenów z rodzaju: *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* oraz lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* w uprawie owoców miękkich oraz wykazującego wpływ na poprawę parametrów jakościowych owoców i ważne w biostymulacji cechy roślin.

Prowadząc badania nad nawozowymi produktami mikrobiologicznymi zawierającymi szczepy z rodzaju *Bacillus*, nieoczekiwanie okazało się, że trzy z nich nie tylko wykazują

właściwości antagonistyczne w stosunku do fitopatogenów *Botrytis* spp., *Verticillium* spp., *Colletotrichum* spp. i *Phytophthora* spp., ale immobilizowane na odpowiednich nośnikach wykazują wzmożone właściwości antagonistyczne w stosunku do tych patogenów roślin, wpływają na zachowanie i/lub poprawę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby, w tym jej zdrowia, jak również wykazują cechy wspomagające biostymulacyjne działanie na wzrost i rozwój roślin oraz parametry jakościowe owoców.

Dlatego też powyższy cel został osiągnięty poprzez opracowanie sposobu otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania sadzonek roślin, zapewniającego i/lub poprawiającego bioróżnorodność mikrobiologiczną gleby przy jednoczesnym kontrolowaniu kluczowych, dla upraw owoców miękkich, patogenów z rodzajów *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora*, jak również poprzez opracowanie kompozycji nawozowego produktu mikrobiologicznego. Przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania unikalnego, zoptymalizowanego składu podłoża płynnego do hodowli bakterii, nośników i innych składników, na których immobilizowane są mikroorganizmy, które doprowadziły do uzyskania unikalnej kompozycji poszczególnych składników nawozowego produktu mikrobiologicznego, które warunkują właściwości i oryginalność opracowanego rozwiązania, stanowiąc jednocześnie zastrzeżenie patentowe.

Istotą sposobu otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania sadzonek roślin, 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 oraz wykazującego wpływ na jakość owoców, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, **jest to**, że stosuje się:

- trzy wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, zawieszony w płynnym nośniku organicznym dla postaci płynnej albo suszony na sypkim nośniku albo liofilizowany na sypkim nośniku dla postaci suchej;
- nośnik właściwy w postaci wywaru melasowego, stanowiący produkt uboczny w procesie fermentacji melasy dla postaci płynnej albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie albo serwatki w proszku, korzystnie kwaśniej neutralizowanej dla postaci proszku do przygotowania żelu;

- dodatek suchych kwasów humusowych dla postaci płynnej produktu albo mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego dla postaci suchej albo mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz gumy ksantanowej dla postaci proszku do przygotowania żelu, jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego korzystnie obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, o sekwencjach odpowiednio nr 1, 2 i 3, 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, sposób w hodowli szczepów bakterii stosuje się inokulum o transmitancji 90%.

Korzystnie hodowlę namnażającą prowadzi się przez 48 godzin.

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

Dla podłoża namnażającego stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.

Preferowanym jest, gdy podłoże namnażające z serwatką zawiera mikroelementy: Mn, Zn, Cu, Co i Mo.

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

Po zakończeniu hodowli, dla uzyskania produktu w postaci suchej, przygotowaną zawiesinę przetrwalników suszy się przy użyciu suszarki rozpyłowej na serwatce w proszku albo poddaje się liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów.

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

Wariantowo dla uzyskania postaci płynnej jako nośnik bakterii stosuje się 1 litr płynnego nośnika organicznego w postaci wywaru melasowego, z dodatkiem suchych kwasów humusowych w ilości 8-12 g/l wywaru melasowego.

W wariacie dla uzyskania postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę suchych kwasów humusowych w ilości 0,80-1,2 g/kg produktu, mielonych nasion gorczycy w ilości 4,0-6,0 g/kg produktu oraz olejku goździkowego w ilości 0,01 ml/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów stosuje się dolomit mikronizowany, stanowiący dopełnienie do 1 kg.

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

Ponadto do postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę suchych kwasów humusowych w ilości 0,80-1,2 g/kg produktu, mielonych nasion gorczycy w ilości 4,0-6,0 g/kg produktu oraz olejku goździkowego w ilości 0,01 ml/kg produktu, a maltodekstryna stanowi dopełnienie do 1 kg.

W innym wariacie dla uzyskania produktu w postaci proszku do przygotowania żelu jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę suchych kwasów humusowych w ilości 8-12 g/kg produktu, mielonych nasion gorczycy w ilości 40-60 g/kg produktu oraz gumy ksantanowej w ilości 30-50 g/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów biopreparatu stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną, stanowiącą dopełnienie do 1 kg.

Istotą nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania sadzonek roślin, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, pozwalającego jednocześnie na kontrolę fitopatogenów: *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazującego cechy biostymulacyjnego działania na rośliny oraz poprawiającego jakość owoców, zawierającego szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, jest to, że zawiera on trzy wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3 na liście sekwencji. Ponadto zawiera nośnik właściwy w postaci wywaru melasowego dla postaci płynnej albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie albo serwatki w proszku dla postaci proszku do przygotowania żelu oraz zawiera dodatek suchych kwasów humusowych jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego dla postaci płynnej albo suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego dla postaci suchej rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wodzie albo suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz gumy ksantanowej dla postaci proszku do przygotowania żelu. Izolaty bakteryjne wyhodowane są na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie i zawieszony na nośniku albo suszony na nośniku albo liofilizowany na nośniku.

Nawozowy produkt mikrobiologiczny zawiera szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3 na liście sekwencji, korzystnie w równym stosunku wagowym.

Izolaty bakteryjne wyhodowane są korzystnie na podłożu namnażającym z serwatką w proszku, najlepiej kwaśną neutralizowaną.

Preferowanym jest, gdy koncentracja każdego ze szczepów bakteryjnych jest w postaci suchej rozpuszczalnej albo nierozpuszczalnej w wodzie albo w postaci proszku do przygotowania żelu w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g, a w postaci płynnej w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/ml.

W wariacie postaci płynnej nawozowy produkt mikrobiologiczny zawiera na 1 litr wywaru melasowego 8-12 g suchych kwasów humusowych.

W wariacie postaci suchej rozpuszczalnej albo nierozpuszczalnej w wodzie nawozowy produkt mikrobiologiczny zawiera dodatek 0,80-1,2 g suchych kwasów humusowych, 4,0-6,0g mielonych nasion gorczycy oraz 0,01 ml olejku goździkowego na 1 kg produktu.

W wariacie postaci proszku do przygotowania żelu nawozowy produkt mikrobiologiczny zawiera dodatek 8-12 g suchych kwasów humusowych, 40-60 g mielonych nasion gorczycy oraz 30-50 g gumy ksantanowej na 1 kg produktu.

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

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

Postać proszku do przygotowania żelu zawiera serwatkę sproszkowaną jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i jako nośnik właściwy. Szczepy *Bacillus* spp. (AF75AB2, AF75BC oraz Sp115AD), wykorzystane do opracowania nawozowego produktu mikrobiologicznego są izolatami środowiskowymi i zostały wyselekcjonowane w Instytucie Ogrodnictwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Skierniewicach i ujawnione w kolekcji SYMBIO BANK tego Instytutu.

Otrzymany nawozowy produkt mikrobiologiczny w formie płynnej, suchej i proszku do przygotowania żelu umożliwia kondycjonowanie sadzonek roślin, utrzymanie i/lub poprawę bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby, a także ma wpływ na cechy wzrostu roślin i jakości owoców oraz wpływa na kontrolowanie czterech istotnych patogenów owoców miękkich, w tym 3 grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* oraz 1 lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*. Należy podkreślić, że nie ma na rynku dostępnych biopreparatów do kondycjonowania sadzonek roślin o potwierdzonej skuteczności pod względem utrzymania i poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby, które opierają się na analizie danych mikrobiomu ryzosfery. Analiza takich danych pozwala określić wpływ na bioróżnorodność mikrobiologiczną gleby, a analiza mikrobiomu korzeni daje możliwość oceny wpływu na bioróżnorodność mikrobiologiczną korzeni. Stąd przedstawione w niniejszym zgłoszeniu patentowym podejście jest unikatowe i innowacyjne i potwierdza korzystny wpływ opracowanego biopreparatu na środowisko glebowe i roślinę, dając podstawy dla uznania

opracowanego bioproduktu za nawozowy produkt mikrobiologiczny. Biopreparat w zależności od postaci stosuje się **bezpośrednio** na korzenie (postać żelowa) lub/i bezpośrednio pod korzenie w formie fertygacji (postać płynna) lub/i dolistnie (poprzez opryskiwanie bądź zraszanie) lub/i pod roślinę poprzez podlewanie (postać sucha do zawieszenia/rozpuszczenia w wodzie), przy czym w przypadku formułacji suchej należy uprzednio sporządzić zawiesinę biopreparatu w wodzie, korzystnie 2-5 kg biopreparatu (o koncentracji bakterii 10^9 jtk/g) na 700-800 l niechlorowanej wody na 1 ha uprawy.

W korzystnym sposobie utrzymania i/lub poprawy bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby lub/i korzeni lub/i cech istotnych dla biostymulacji wzrostu i rozwoju roślin i jakości owoców lub/i kontroli patogenów roślin biopreparat stosuje się w ilości korzystnie 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. W korzystnym sposobie oddziaływania postaci płynnej do fertygacji nawozowy produkt mikrobiologiczny stosuje się korzystnie w formie trzech iniekcji w ciągu sezonu wegetacyjnego w ilości 15 l biopreparatu na iniekcję na 15 000 l wody w przeliczeniu na 1 ha w odstępach 3-4 tygodniowych albo w formie 12 iniekcji aplikowanych co tydzień przez 12 tygodni wegetacji roślin w ilości 2 l biopreparatu na iniekcję na 2 000 l wody w przeliczeniu na 1 ha. W korzystnym sposobie ochronnego działania na korzenie roślin preparatu żelowego (postać proszku, który po dodaniu odpowiedniej ilości wody przechodzi w stan żelu, lepkiej cieczy) nawozowy produkt mikrobiologiczny aplikuje się na korzenie sadzonek roślin, wykorzystywanych podczas zakładania plantacji, tak by dawka preparatu na roślinę korzystnie wynosiła około 2 ml w przypadku roślin truskawki albo 10-20 ml w przypadku roślin maliny, przy czym preparat przygotowuje się korzystnie poprzez zawieszenie 1 g sproszkowanej postaci bioproduktu w 10 ml wody. Nawozowy produkt mikrobiologiczny stosuje się w postaci żelu (**zawiesina preparatu w nośniku żelowym**), który aplikowany jest na korzenie sadzonek roślin poprzez ich kondycjonowanie (moczenie sadzonek w przygotowanym preparacie). Preparat przygotowuje się poprzez zawieszenie 100 g preparatu w formie sypkiej w 1 litrze wody wodociągowej, korzystnie niechlorowanej, przy czym zawiesinę należy dokładnie wymieszać. Tak przygotowany biopreparat jest gotowy do aplikacji na sadzonki roślin. Kondycjonowanie sadzonek w opracowanym nawozowym produkcie mikrobiologicznym

pozytywnie wpływa na ukorzenianie roślin i ich wzrost wegetatywny jak również chroni rozwijające się rośliny przed infekcjami patogenami.

Wynalazek został uwidoczniiony na przykładach wykonania i na rysunku, gdzie:

Fig.1 przedstawia wygląd kolonii szczepów bakteryjnych AF75AB2, AF75BC, Sp115AD na podłożu PCA (Plate Count Agar), hodowla 48-godzinna;

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

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

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

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

Fig.6 przedstawia profile aktywności enzymatycznej szczepów bakteryjnych będących składnikami nawozowego produktu mikrobiologicznego, określone na podstawie testów API ZYM (Biomérieux);

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

Fig.8 przedstawia antagonizm bakteryjnego biopreparatu żelowego, zawierającego szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD wobec roślinnych patogenów grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*;

Fig.9 przedstawia tabelę dotyczącą antagonizmu nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD w postaci płynnej do fertygacji, suchej nierozpuszczalnej w wodzie, suchej rozpuszczalnej w wodzie oraz żelowej, wobec roślinnych patogenów

grzybowych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Verticillium* i grzybopodobnego lęgniowca z rodzaju *Phytophthora*;

Fig.10 przedstawia antagonizm nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *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* po 1 miesiącu przechowywania biopreparatu w temperaturze pokojowej około 21°C;

Fig.11 przedstawia antagonizm nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *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), 4°C oraz 35°C;

Fig.12 przedstawia antagonizm nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD w postaci płynnej do fertygacji (nośnik – wywar melasowy) 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) i po 6 miesiącach przechowywania biopreparatu w temperaturze 4°C;

Fig.13 przedstawia efektywną liczbę gatunków (ENS) bakterii w ryzosferze malin po zastosowaniu nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.14 przedstawia efektywną liczbę gatunków (ENS) grzybów w korzeniu roślin maliny po zastosowaniu nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.15 przedstawia względny skład procentowy grup troficznych grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.16 przedstawia występowanie gildii funkcjonalnych w grupach obejmujących patotrofy grzybowe występujące w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego

produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.17 przedstawia względną obfitość typów bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.18 przedstawia względną obfitość klas bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.19 przedstawia względną obfitość – bioróżnorodność rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków bakterii występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD, przy czym im więcej kolorowych prążków tym większa jest bioróżnorodność bakterii;

Fig.20 przedstawia względną obfitość typów grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.21 przedstawia względną obfitość klas grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD;

Fig.22 przedstawia względną obfitość – bioróżnorodność rzędów, rodzin, rodzajów i gatunków grzybów występujących w ryzosferze oraz korzeniu roślin maliny po aplikacji nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD, przy czym im więcej kolorowych prążków tym większa jest bioróżnorodność grzybów;

Fig.23 przedstawia postać nawozowego preparatu mikrobiologicznego do przygotowania żelu oraz sposób aplikacji upłynnionej formy żelowej na korzenie roślin a) proszek przed dodaniem wody, b) upłynniona postać żelu do aplikacji na korzenie, c) aplikacja na sadzonki korzeniowe rośliny truskawki, d) wygląd korzenia po aplikacji biopreparatu.

PRZYKŁADY

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

Trzy szczepy bakteryjne wybrane do wykorzystania w nawozowym produkcie mikrobiologicznym, wyselekcjonowane z gleby ryzosferowej, pochodzące z kolekcji SYMBIO BANK Instytutu Ogrodnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach, zostały zidentyfikowane na podstawie sekwencjonowanie genu 16S rDNA. Uzyskane w wyniku sekwencjonowania metodą Sangera sekwencje nukleotydowe zostały poddane analizie porównawczej z sekwencjami nukleotydowymi znajdującymi się w komercyjnej bazie danych MicroSeq^{ID} oraz w otwartej bazie danych NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Na podstawie analizy molekularnej i bioinformatycznej zidentyfikowano szczep bakterii AF75AB2 – sekwencja nr 1, do gatunku *Bacillus subtilis*, natomiast szczep AF75BC – sekwencja nr 2 i szczep Sp115AD – sekwencja nr 3, zostały zidentyfikowane do rodzaju *Bacillus*.

Szczepy AF75AB2, AF75BC oraz Sp115AD zostały scharakteryzowane pod względem podstawowych właściwości metabolicznych, które wpływają na właściwości biochemiczne środowiska glebowego. Wykazano, że szczepy charakteryzowały się bardzo dobrym wzrostem o kremowym zabarwieniu na podłożu agarowym PCA – Plate Count Agar (Fig.1). Aktywność biochemiczna szczepów wchodzących w skład biopreparatu została scharakteryzowana na podstawie zdolności do utylizacji 71 substratów węglowych należących do związków: aminokwasów, alkoholi cukrowych, węglowodanów, kwasów cukrowych, pochodnych cukrowych oraz kwasów karboksylowych (Fig.2), jak również określenia stopnia wzrostu w obecności tych substratów (Fig.3). Określono wrażliwość chemiczną szczepów AF75AB2, AF75BC oraz Sp115AD wobec 23 związków chemicznych należących m.in. do antybiotyków i barwników. Wrażliwość szczepów bakteryjnych na te związki oceniono na podstawie zahamowania ich procesów respiracyjnych i przedstawiono w postaci profilu intensywności oddechowej poszczególnych związków chemicznych (Fig.4), jak również poprzez ocenę zahamowania stopnia wzrostu bakterii w obecności badanych związków (Fig.5). Ponadto za pomocą szybkiego testu biochemicznego API ZYM (Biomérieux) określono aktywność podstawowych enzymów hydrolitycznych m.in. fosfataz, esteraz, arylamidaz, fosfohydrolazy,

β -glukozydazy, β -galaktozydazy, mannozydazy, glukozaminidazy wybranych szczepów bakteryjnych (Fig.6). Zdolności biochemiczne szczepów oznaczono zgodnie z wytycznymi metodycznymi testu przygotowując zawiesinę bakteryjną o gęstości 5-6 w skali McFerland'a. Wszystkie trzy szczepy AF75AB2, AF75BC oraz Sp115AD wykazywały się aktywnością esterazy, esterazy lipazy, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI oraz β -glukozydazy. Wysoką aktywnością lipazy, α -galaktozydazy i N-acetylo- β - glukozaminidaza charakteryzowały się szczepy AF75AB2 i AF75BC. Natomiast szczep Sp115AD jako jedyny spośród trzech badanych izolatów wykazał aktywność fosfatazy alkalicznej, aryamidazy leucyny i α -glukozydazy (Fig.7).

Przykład 2. Określenie zdolności antagonistycznych nawozowego produktu mikrobiologicznego zawierającego szczepy bakteryjne Bacillus subtilis AF75AB2, Bacillus sp. AF75BC, Bacillus sp. Sp115AD wobec roślinnych patogenów z rodzaju Colletotrichum, Botrytis, Phytophthora oraz Verticillium – eksperyment szalkowy

Zdolności antagonistyczne preparatu bakteryjnego w postaci żelu określono na podstawie pomiaru stref zahamowania wzrostu patogenów. Płytki Petriego o średnicy 90 mm z podłożem agarowym PCA (Plate Count Agar) zaszczipiano 300 μ l zawiesiny zarodników (o transmitancji 70%) grzybów fitopatogenicznych *Colletotrichum* sp. (G171/18), *Botrytis* sp. (G277/18) i *Verticillium* sp. (G297/18) oraz grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora* sp. (G408/18). Płytki inkubowano w temperaturze 23°C przez 24 godziny. Następnie po wstępnej inkubacji na środku płytki umieszczano biopreparat w postaci przygotowanego żelu (ok. 20-30 μ l). Płytki inkubowano w temperaturze 23°C, przez 5-7 dni i dokonywano pomiaru stref zahamowania wzrostu lub/i zahamowania zarodnikowania, potwierdzając antagonistyczne działanie opracowanego nawozowego produktu mikrobiologicznego wobec kluczowych fitopatogenów owoców miękkich (Fig.8-Fig.9).

Przeprowadzono też badania przechowalnicze, w ramach których okresowo w czasie 6 miesięcy przechowywania biopreparatu w różnych warunkach, w tym w temperaturze pokojowej (~21°C), warunkach chłodniczych (4°C) oraz w podwyższonej temperaturze składowania (35°C), określano właściwości antagonistyczne biopreparatu na różnych nośnikach – płynnym (wywar melasowy), nierozpuszczalnym w wodzie (dolomit mikronizowany), rozpuszczalnym w wodzie (maltodekstryna), do przygotowania żelu (serwatka z gumą ksantanową). 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.10-Fig.12). Najlepsze właściwości antagonistyczne po 1 miesiącu przechowywania nawozowego produktu mikrobiologicznego, w którym bakterie immobilizowane były na maltodekstrynie uzyskano wobec grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora* sp., wykazując właściwości biobójcze i niedopuszczając do rozwoju tego patogenu, a dla badanych fitopatogenów grzybowych zaobserwowano działanie fungistatyczne bioproduktu, objawiające się hamowaniem zarodnikowania grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* (Fig.10). Nawozowy produkt mikrobiologiczny immobilizowany na dolomicie mikronizowanym po 3 miesiącach przechowywania, niezależnie od zastosowanej temperatury, wykazał się najbardziej skutecznym oddziaływaniem wobec fitopatogenów z rodzaju *Phytophthora*, *Botrytis* i *Verticillium*, a w przypadku *Colletotrichum* sp. spowodował zahamowanie zarodnikowania tego grzyba (Fig.11). Najlepsze właściwości antagonistyczne po 6 miesiącach przechowywania biopreparatu płynnego do fertygacji uzyskano wobec fitopatogenów z rodzaju *Phytophthora*, *Botrytis* i *Verticillium*, wykazując właściwości biobójcze i niedopuszczając do rozwoju tych patogenów, a także fungistatyczne, objawiające się hamowaniem zarodnikowania grzybów z rodzaju *Colletotrichum* (Fig.12).

Przykład 3. Określenie liczebności bakterii w nawozowym produkcie mikrobiologicznym

Liczebność bakterii w przygotowanym nawozowym produkcie mikrobiologicznym określono metodą wysiewu rozcieńczeń, poprzez zliczenie i określenie ogólnej liczebności bakterii. Przygotowano szereg rozcieńczeń biopreparatu od 10^{-1} do 10^{-8} , z każdego rozcieńczenia wysiano po 0,1 ml na płytkę Petriego o średnicy 90 mm z podłożem PCA, rozprowadzono równomiernie po płytce po czym inkubowano w temperaturze 26°C , przez 72 godziny. Wyrosłe kolonie zliczono i wyznaczono ogólną liczebność bakterii w poszczególnych formułacjach nawozowego produktu mikrobiologicznego, w tym w płynnej jtk/ml i suchych jtk/g.

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 oraz $>10^8$ jtk/g biopreparatu bakteryjnego w postaci żelowej. 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 biopreparatu w zależności od zastosowanych warunków przechowywania przez okres 6 miesięcy.

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

W celu określenia działania nawozowego produktu mikrobiologicznego na bioróżnorodność mikrobiologiczną gleby i mikrobiom roślin przeprowadzono eksperyment szklarniowy na roślinach maliny odmiany Polana. Rośliny posadzono do doniczek o pojemności 3 litrów zawierających podłoże wzrostowe składające się z ½ objętości gleby i ½ objętości torfu o granulacji 7-20 mm. Biopreparat zaaplikowano na powierzchnię korzeni, a kombinację kontrolną stanowiły rośliny nietraktowane preparatem, rosące w podłożu z dodatkiem 5 g suszonego obornika na doniczkę. W przykładzie wykonania biopreparat zastosowano w formie żelowej. 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. Nawozowy produkt mikrobiologiczny spowodował zwiększenie bioróżnorodności bakterii w ryzosferze w stosunku do kontroli (Fig.13) oraz zachowanie bioróżnorodności grzybów na poziomie wariantu kontrolnego. Ponadto biopreparat spowodował zmniejszenie ENS grzybów zasiedlających korzeń w stosunku do próbek kontrolnych korzeni nietraktowanych biopreparatem, co może wskazywać na działanie ochronne zaaplikowanego biopreparatu żelowego bezpośrednio na korzenie sadzonek (Fig.14). Dokonano również analizy grup troficznych i gildii funkcjonalnych grzybów z wykorzystaniem bazy danych FunGuild. Wyniki te wykazały, że w korzeniu roślin traktowanych nawozowym produktem mikrobiologicznym zaobserwowano obniżenie mieszanych trybów troficznych, zawierających patotrofy: patotrofów-saprotrofów i patotrofów-saprotrofów-symbiotrofów, a także odnotowano zwiększenie saprotrofów i symbiotrofów oraz trybu mieszanego saprotrof-symbiotrof w korzeniu. Wykazano również bardzo duże zwiększenie trybu mieszanego

grzybów sapro-symbiotrofów w ryzosferze malin traktowanych nawozowym produktem mikrobiologicznym, a także obniżenie patotrofów oraz trybu mieszanego patotrof-saprotrof-symbiotrof (Fig.15). Dodatkowo wykazano, że w po aplikacji bioproduktu zmniejszyła się ilość gildii przypisanych do patogenów roślin zarówno w ryzosferze roślin, jak też w korzeniu (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 korzeniu roślin malin traktowanych biopreparatem, a w ryzosferze utrzymanie podobnego poziomu lub obniżenie obfitości grzybów w porównaniu do kontroli nietraktowanej biopreparatem, co może wskazywać na ochronne działanie nawozowego produktu mikrobiologicznego, ograniczając wnikanie do korzeni, zwłaszcza niekorzystnych dla roślin grzybów (Fig.20-Fig.22).

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

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

W celu określenia wpływu nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus*

sp. Sp115AD na plonowanie roślin oraz występowanie fitopatogenów przeprowadzono doświadczenia polowe, w których do technologii uprawy został wprowadzony nawozowy produkt mikrobiologiczny, jako jeden z komponentów całej technologii uprawy stosowanej w uprawie ekologicznej truskawki i maliny. Testy prowadzono na trzech odmianach truskawki Honeoye, Rumba i Vibrant w przypadku formulacji suchej nierozpuszczalnej w wodzie w dwóch sposobach uprawy nawadnianym i nienawadnianym w ekologicznym systemie produkcji oraz dla dwóch odmian truskawki Honeoye i Rumba w przypadku postaci płynnej do fertygacji, stosując 3- i 12-krotną iniekcję bioproduktu w sezonie wegetacyjnym. Dodatkowo testy opracowanego nawozowego produktu mikrobiologicznego w formie żelowej oraz suchej nierozpuszczalnej w wodzie, wprowadzonego jako jeden z elementów technologii produkcji malin ekologicznych, prowadzono w oparciu o doświadczenie z czterema odmianami malin: Delniwa, Enrosadira, Rosalita i Poemat. Uzyskane wyniki wskazują, że gatunki i odmiany roślin różnie reagowały na testowane technologie uprawy, w tym dodatek nawozowego produktu mikrobiologicznego, zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii. W obiekcie nawadnianym i nienawadnianym, w wariantach, w których wprowadzono dodatek opracowanego nawozowego produktu mikrobiologicznego, zastosowanego w drugim roku w formie suchej nierozpuszczalnej w wodzie, zaobserwowano największą zwyżkę plonu truskawki. Zaobserwowano, że u odmiany Honeoye w obiekcie nienawadnianym, w wariacie, w którym zastosowano dodatek biopreparatu bakteryjnego, zmniejszyło się porażenie antraknozą. Odmiana Vibrant zareagowała natomiast zmniejszeniem porażenia skórzastą zgnilizną owoców truskawki. Dla malin odmian Delniwa, Poemat i Enrosadira nawozowy produkt mikrobiologiczny znacząco zwiększał zawartość antocyjanów oraz związków fenolowych w dwóch sezonach uprawy, co świadczy o poprawie parametrów jakościowych owoców. Ponadto wykazano, że bioprodukt podnosił jakość owoców truskawki (Honeoye, Vibrant, Rumba), objawiający się zwiększeniem zawartości witaminy C oraz antocyjanów. Wyniki wskazują, że dla niektórych odmian maliny, zwłaszcza Enrosadira i Rosalita, zaobserwowano zwiększenie różnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów glebowych, a także zasiedlających roślinę i owoce. Efekt ten dotyczył przede wszystkim zwiększenia wskaźników bioróżnorodności, w tym AWCD (Average Well Colour Development), który jest miarą ogólnej aktywności mikrobiologicznej oraz R (Richness), który informuje o liczbie uruchamianych substratów węglowych przez zbiorowiska mikroorganizmów. Przeprowadzone badania wskazują, że aktywność metaboliczna mikroorganizmów występujących w roślinie i owocu zwiększyła się w szczególności w stosunku do węglowodanów, w **wariacie**, w którym

jako jeden z elementów uprawy zastosowany był opracowany biopreparat bakteryjny w formie żelu.

Przykład 6. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formulacja płynna

Do otrzymania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania sadzonek roślin, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, wpływającego na wzrost i rozwój roślin oraz parametry jakościowe owoców, pozwalającego jednocześnie na kontrolę fitopatogenów (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.) w uprawie owoców miękkich, zastosowano 3 wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, niewykluczające swojego działania następujące szczepy bakterii: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3, na liście sekwencji, dla których prowadzono osobne hodowle, które mieszano w równych proporcjach, w celu uzyskania kompozycji zawierającej wyizolowane z ryzosfery szczepy saprofitycznych bakterii, a hodowle namnażające prowadzono w temperaturze w 30°C.

Po wstępnym namnożeniu bakterii na agarowym podłożu Plate Count Agar w ciągu 24-48 godzin w temperaturze 25-26°C, uzyskanym inokulum zaszczepiano podłoże namnażające i prowadzono hodowlę wytrząsaną (120 rpm) przez 48 godzin w temperaturze 30°C. Pożywką namnażającą do wytworzenia 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, 0,27 mM CuCl₂*2 H₂O, 0,23 mM CoCl₂*6 H₂O, 0,23 mM Na₂MoO₄*2 H₂O. Po otrzymaniu miana hodowli namnażającej przeprowadzono etap indukcji przetrwalnikowania poprzez zmianę warunków hodowli, obejmującą zmianę zasolenia podłoża hodowlanego, poprzez dodatek KCl, tak by zasolenie wynosiło 4%. Po 48 godzinach hodowli hodowle pasteryzowano poprzez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut. Tak przygotowana zawiesina przetrwalników była liofilizowana z dodatkiem serwatki w proszku jako krioprotektanta w ilości 5% świeżej masy zwirowanych mikroorganizmów, przy czym uzyskane liofilizaty miały liczebność 10¹¹ jtk/g. W celu uzyskania płynnej postaci nawozowego produktu mikrobiologicznego do 1 litra płynnego nośnika organicznego, który stanowiła vinassa – wywar melasowy, będący produktem ubocznym powstającym w procesie fermentacji melasy, **dodawano** 10 g suchych kwasów humusowych oraz po 10 g każdego liofilizatu bakteryjnego (*Bacillus subtilis*

AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD) o koncentracji bakterii 10^{11} jtk/g. Po połączeniu składników uzyskano nawozowy produkt mikrobiologiczny o formułacji płynnej do fertygacji, charakteryzujący się liczebnością bakterii 10^9 jtk/ml bioproduktu.

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

Sposób prowadzono jak w Przykładzie 6., z tym że po zakończeniu hodowli i uzyskaniu liofilizatów, dla uzyskania nierozpuszczalnej w wodzie formułacji suchej do oprysku bądź podlewania, zamiast płynnego nośnika organicznego z suchymi kwasami humusowymi zastosowano nośnik w postaci 991 g dolomitu mikronizowanego z dodatkiem 1 g suchych kwasów humusowych, 5 g mielonych nasion gorczycy, 0,01 ml olejku goździkowego oraz po 1 g każdego liofilizatu bakteryjnego (*Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD) o koncentracji bakterii 10^{11} jtk/g.

Przykład 8. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formułacja sucha rozpuszczalna w wodzie

Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego prowadzono jak w Przykładzie 6. i 7. z tym, że do procesu liofilizacji zamiast dodatku serwatki w proszku dodano maltodekstrynę i zamiast nośnika w postaci dolomitu mikronizowanego zastosowano maltodekstrynę.

Przykład 9. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego –zawierająca suszone rozpyłowo szczepy bakterii

Nawozowy produkt mikrobiologiczny otrzymany sposobem według Przykładu 6. posiada skład analogiczny jak w przykładzie 6., z **tym**, że zamiast liofilizacji stosuje się suszenie rozpyłowe.

Przykład 10. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego – formułacja do przygotowania żelu

Sposób otrzymywania bioproduktu prowadzono jak w przykładzie 6. z tym, że po zakończeniu hodowli poddano ją zamiast liofilizacji suszeniu rozpyłowemu i zamiast płynnego nośnika organicznego z suchymi kwasami humusowymi zastosowano nośnik w postaci mieszaniny 10 g suchych kwasów humusowych, 50 g mielonych nasion gorczycy, 40 g gumy ksantanowej i 900 g serwatki w proszku kwaśnej neutralizowanej, zawierającej trzy szczepy bakterii (*Bacillus subtilis* AF75AB2, *Bacillus* sp. AF75BC, *Bacillus* sp. Sp115AD) o koncentracji 10^9 jtk/g. Sposób przygotowania i nakładania biopreparatu na korzenie przedstawiono na figurze 23 (Fig. 23).

ZASTRZEŻENIA PATENTOWE

1. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego do kondycjonowania sadzonek roślin, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, pozwalającego jednocześnie na kontrolę fitopatogenów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazującego cechy biostymulacyjnego działania na rośliny oraz poprawy parametrów jakościowych owoców, z zastosowaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, **znamienny tym**, że stosuje się:

- trzy wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3 na liście sekwencji, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, zawieszony w płynnym nośniku organicznym dla postaci płynnej albo suszony na sypkim nośniku albo liofilizowany na sypkim nośniku dla postaci suchej;
- nośnik właściwy w postaci wywaru melasowego, stanowiący produkt uboczny w procesie fermentacji melasy dla postaci płynnej albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie albo serwatki w proszku, korzystnie kwaśniej neutralizowanej dla postaci proszku do przygotowania żelu;
- dodatek suchych kwasów humusowych dla postaci płynnej produktu albo mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego dla postaci suchej albo mieszaniny suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz gumy ksantanowej dla postaci proszku do przygotowania żelu, jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego.

2. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 1, **znamienny tym**, że obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, o sekwencjach odpowiednio nr 1, 2 i 3, wskazanych na liście sekwencji, w którym szczepy bakterii namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu agarowym Plate Count Agar, w temperaturze 25-30°C przez 24-48 godzin, a następnie tak przygotowanym inokulum szczepi się płynne podłoże namnażające, w ilości 5%-15% objętości podłoża hodowlanego i prowadzi się hodowlę namnażającą w warunkach hodowli wytrząsanej w temperaturze 30°C przy 120 rpm.
3. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się inokulum o transmitancji 90%.
4. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że hodowlę namnażającą prowadzi się przez 48 godzin.
5. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że podłoże namnażające zawiera w 1 litrze: 20 g serwatki, 6,6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,022 g CaCl₂, 0,18 g MgSO₄, 12,9 mg FeCl₂, w granicach ±10% każdego ze składników podłoża.
6. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że dla podłoża namnażającego stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną.
7. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że podłoże namnażające z serwatką zawiera mikroelementy: Mn, Zn, Cu, Co i Mo.
8. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 2-7, **znamienny tym**, że po otrzymaniu miana hodowli namnażającej nie mniejszego niż 10⁹ jtk/ml przeprowadza się etap indukcji przetrwalnikowania, korzystnie zmieniając zasolenie podłoża hodowlanego, poprzez dodatek KCl, do uzyskania zasolenia 4% i po 48 godzinach hodowli i wytworzeniu przetrwalników przez komórki bakteryjne hodowlę pasteryzuje się poprzez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 minut i otrzymaną zawiesinę przetrwalników stosuje się jako główny komponent nawozowego produktu mikrobiologicznego.
9. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 2-8, **znamienny tym**, że po zakończeniu hodowli, dla uzyskania produktu w postaci suchej, przygotowaną zawiesinę przetrwalników suszy się przy użyciu suszarki rozpyłowej na

serwatce w proszku albo poddaje się liofilizacji z dodatkiem serwatki w proszku jako krioprotektanta, w ilości 5% świeżej masy zwirowanych drobnoustrojów.

10. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-9, **znamienny tym**, że wysuszone bakterie albo liofilizaty bakteryjne o koncentracji nie mniejszej niż 10^{11} jtk/g dodaje się w równych ilościach do uzyskania produktu o koncentracji każdego ze szczepów w zakresie $10^8 - 10^{11}$ jtk/g.

11. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego zastrz. 1-8, **znamienny tym**, że dla uzyskania postaci płynnej jako nośnik bakterii stosuje się 1 litr płynnego nośnika organicznego w postaci wywaru melasowego, z dodatkiem suchych kwasów humusowych w ilości 8-12 g/l wywaru melasowego.

12. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-10, **znamienny tym**, że do postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę suchych kwasów humusowych w ilości 0,80-1,2 g/kg produktu, mielonych nasion gorczycy w ilości 4,0-6,0 g/kg produktu oraz olejku goździkowego w ilości 0,01 ml/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów stosuje się dolomit mikronizowany, stanowiący dopełnienie do 1 kg.

13. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-10, **znamienny tym**, że dla uzyskania postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie, jako krioprotektant bakterii w procesie suszenia rozpyłowego albo liofilizacji oraz nośnik wszystkich komponentów nawozowego produktu mikrobiologicznego, stosuje się maltodekstrynę.

14. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-10, albo 13, **znamienny tym**, że do postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę suchych kwasów humusowych w ilości 0,80-1,2 g/kg produktu, mielonych nasion gorczycy w ilości 4,0-6,0 g/kg produktu oraz olejku goździkowego w ilości 0,01 ml/kg produktu, a maltodekstryna, stanowi dopełnienie do 1 kg.

15. Sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego według dowolnego z zastrz. 1-10, **znamienny tym**, że dla uzyskania produktu w postaci proszku do przygotowania żelu jako komponent nośnika stosuje się mieszaninę suchych kwasów humusowych w ilości 8-12 g/kg produktu, mielonych nasion gorczycy w ilości 40-60 g/kg produktu oraz gumy ksantanowej w ilości 30-50 g/kg produktu, a jako nośnik wszystkich komponentów biopreparatu stosuje się serwatkę w proszku, korzystnie kwaśną neutralizowaną, stanowiącą dopełnienie do 1 kg.

16. Nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania sadzonek roślin, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów: *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp. w uprawie owoców miękkich, wykazujący cechy biostymulacyjnego działania na rośliny oraz poprawy jakości owoców, zawierający szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, **znamienny tym**, że zawiera trzy wyselekcjonowane z ryzosfery zdrowych roślin, nie wykazujące wzajemnego antagonistycznego działania izolaty bakteryjne: *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3 na liście sekwencji, nośnik właściwy w postaci wywaru melasowego dla postaci płynnej albo dolomitu mikronizowanego dla postaci suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny dla postaci suchej rozpuszczalnej w wodzie albo serwatki w proszku dla postaci proszku do przygotowania żelu oraz zawiera dodatek suchych kwasów humusowych jako uzupełniających komponentów nośnika właściwego dla postaci płynnej albo suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz olejku goździkowego dla postaci suchej rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wodzie albo suchych kwasów humusowych, mielonych nasion gorczycy oraz gumy ksantanowej dla postaci proszku do przygotowania żelu, 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.

17. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według zastrz. 16, **znamienny tym**, że zawiera szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3 na liście sekwencji, w równym stosunku wagowym.

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

19. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 16-18, **znamienny tym**, że koncentracja każdego ze szczepów bakteryjnych jest w postaci suchej rozpuszczalnej albo nierozpuszczalnej w wodzie albo w postaci proszku do przygotowania żelu w zakresie 10^8 – 10^{11} jtk/g, a w postaci płynnej w zakresie 10^8 – 10^{11} jtk/ml..

20. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 16-19, **znamienny tym**, że jego postać płynna zawiera na 1 litr wywaru melasowego 8-12 g suchych kwasów humusowych.

21. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 16-19, **znamienny tym**, że jego postać sucha rozpuszczalna albo nierozpuszczalna w wodzie zawiera dodatek 0,80-1,2 g suchych kwasów humusowych, 4,0-6,0 g mielonych nasion gorczycy oraz 0,01 ml olejku goździkowego na 1 kg produktu.
22. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 16-19, **znamienny tym**, że jego postać proszku do przygotowania żelu zawiera dodatek 8-12 g suchych kwasów humusowych, 40-60 g mielonych nasion gorczycy oraz 30-50 g gumy ksantanowej na 1 kg produktu.
23. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 16-19 albo 21 **znamienny tym**, że jego postać sucha nierozpuszczalna w wodzie zawiera serwatkę sproszkowaną jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i dolomit mikronizowany jako nośnik właściwy.
24. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 16-19 albo 21, **znamienny tym**, że jego postać sucha rozpuszczalna w wodzie zawiera maltodekstrynę jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i jako nośnik właściwy.
25. Nawozowy produkt mikrobiologiczny według dowolnego zastrz. 16-19 albo 22, **znamienny tym**, że jego postać proszku do przygotowania żelu zawiera serwatkę sproszkowaną jako krioprotektant w procesie liofilizacji lub suszenia rozpyłowego i jako nośnik właściwy.

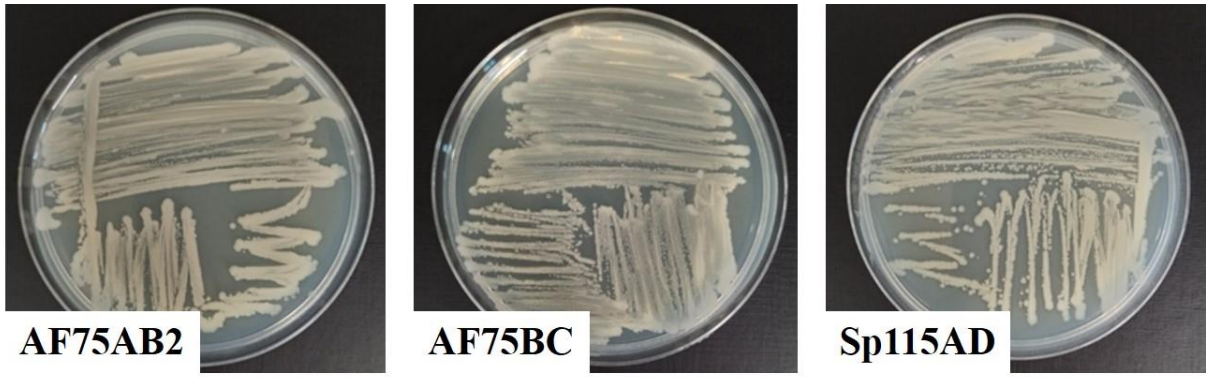


Fig. 1



Fig. 2

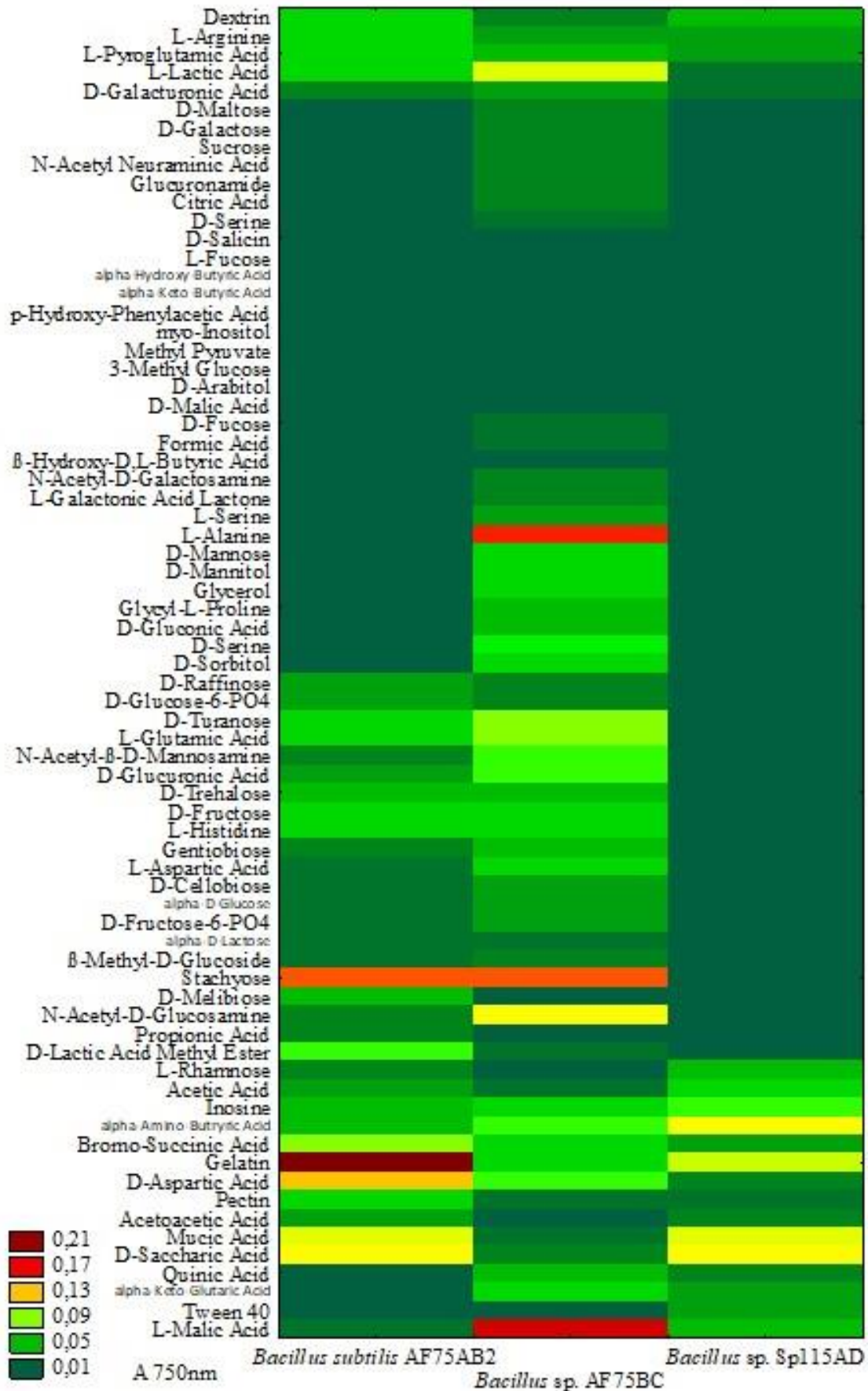


Fig. 3

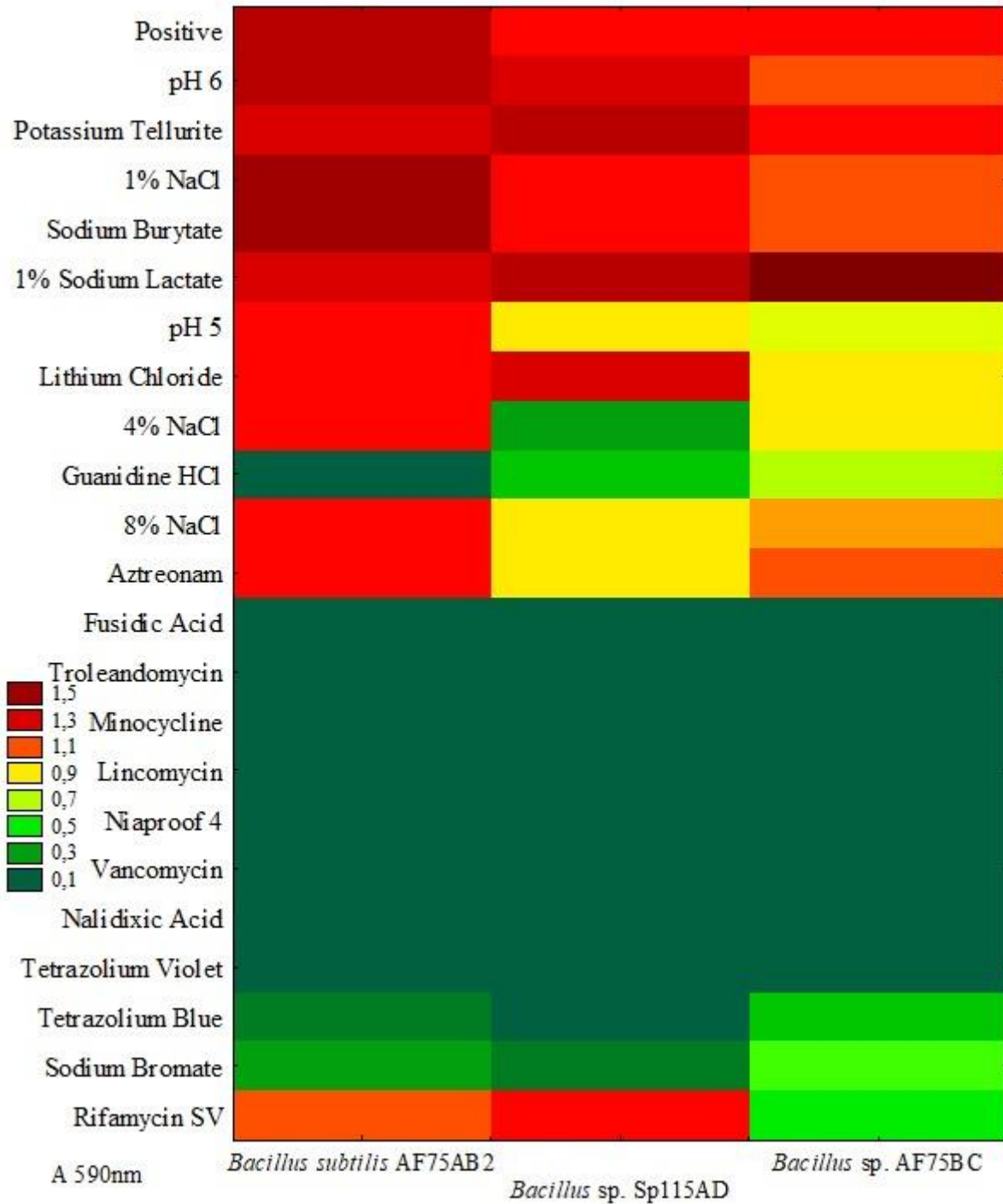


Fig. 4

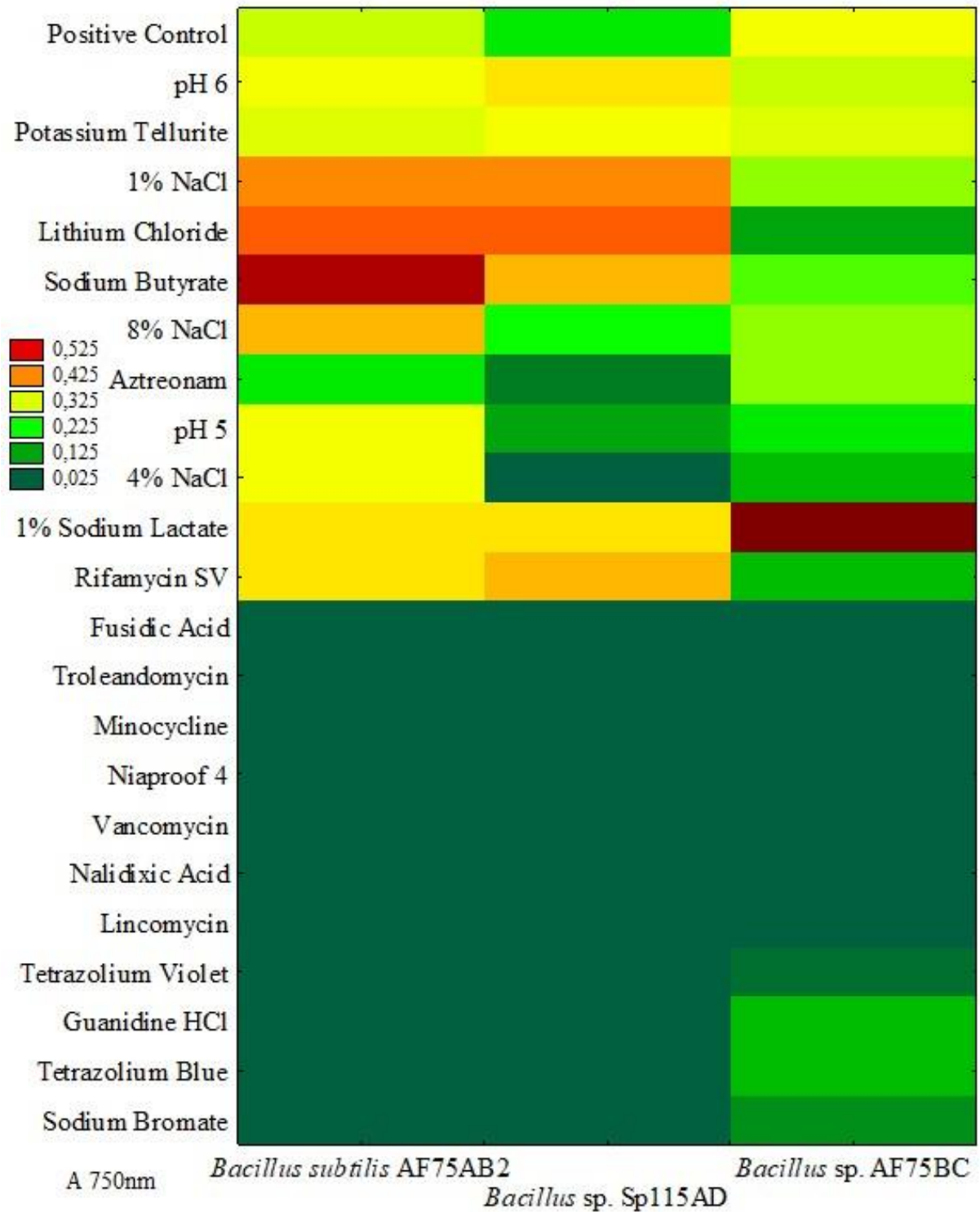


Fig. 5



Fig. 6

Aktywność enzymatyczna	Zastosowany substrat	<i>Bacillus subtilis</i> AF75AB2	<i>Bacillus</i> sp. AF75BC	<i>Bacillus</i> sp. 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-naftyamid	-	+	-
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

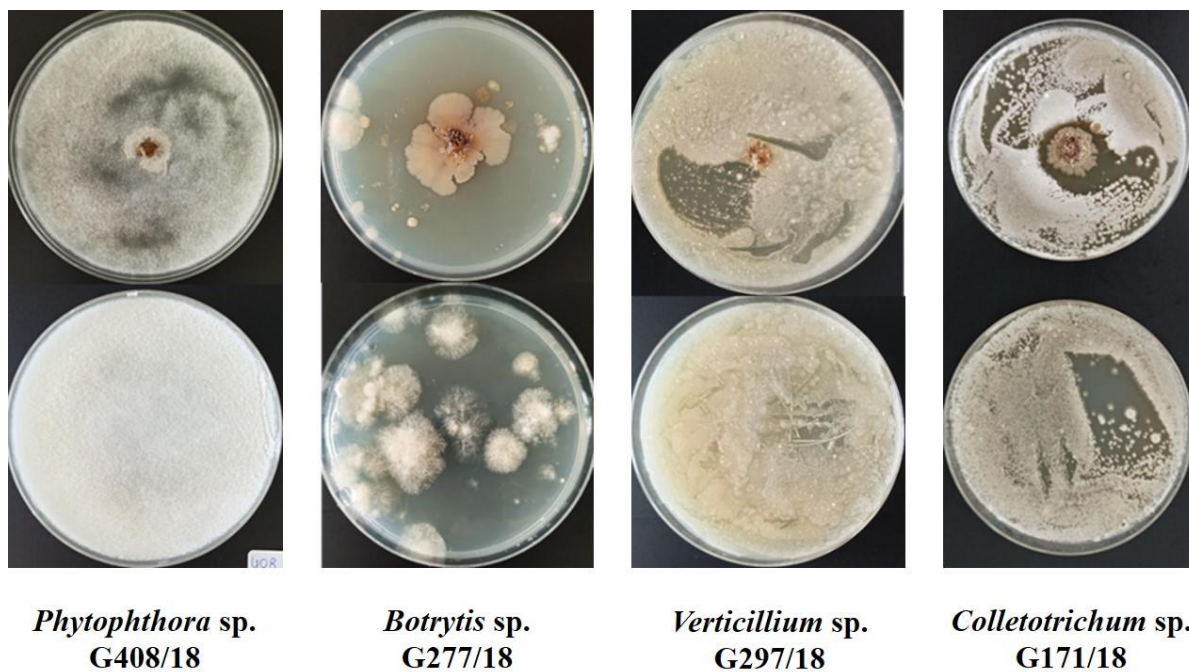
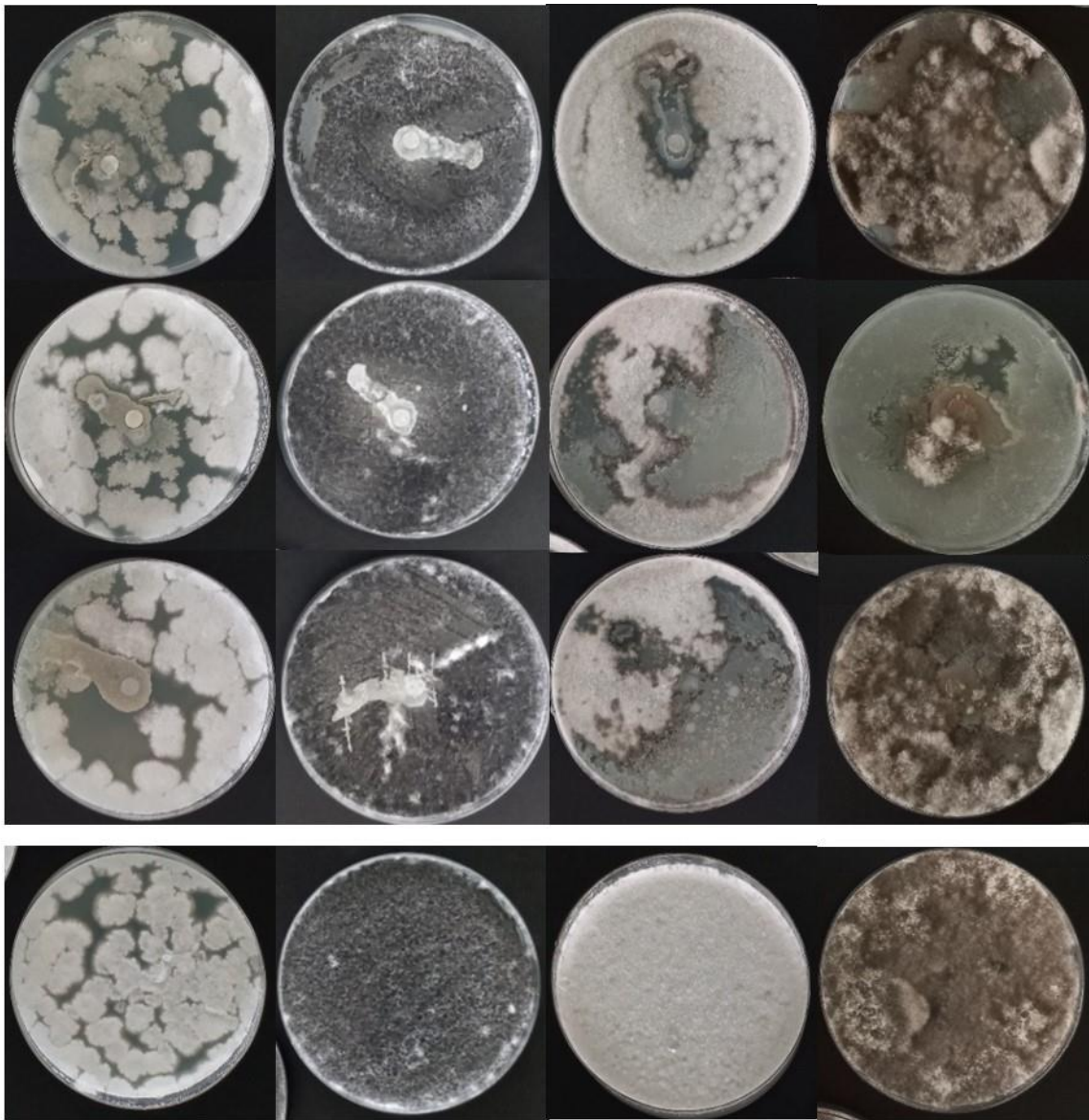


Fig. 8

Patogen roślinny	Strefa zahamowania wzrostu (mm) – postać bioproduktu płynna do fertygacji	Strefa zahamowania wzrostu (mm) – postać bioproduktu sucha nierozpuszczalna w wodzie	Strefa zahamowania wzrostu (mm) – postać bioproduktu sucha rozpuszczalna w wodzie	Strefa zahamowania wzrostu (mm) – postać żelowa bioproduktu
<i>Phytophthora</i> sp. G408/18 / G184/21	53,70 ±13,20	80,00 ±17,00	42,00 ±2,60	ograniczenie zarodnikowania
<i>Botrytis</i> sp. G277/18 / G276/18	61,70 ±16,00	90,00 ±00,00	49,00 ±11,30	51,00 ±0,00
<i>Verticillium</i> sp. G297/18 / G296/18	14,70 ±3,00	66,70 ±40,40	18,00 ±2,60	10,00 ±0,00
<i>Colletotrichum</i> sp. G171/18	22,30 ±14,80	14,00 ±6,90	46,70 ±8,40	19,00 ±0,00

Fig. 9



Phytophthora sp.

G184/21

kontrola

Verticillium sp.

G296/18

kontrola

Colletotrichum sp.

G171/18

kontrola

Botrytis sp.

G276/18

kontrola

Fig. 10

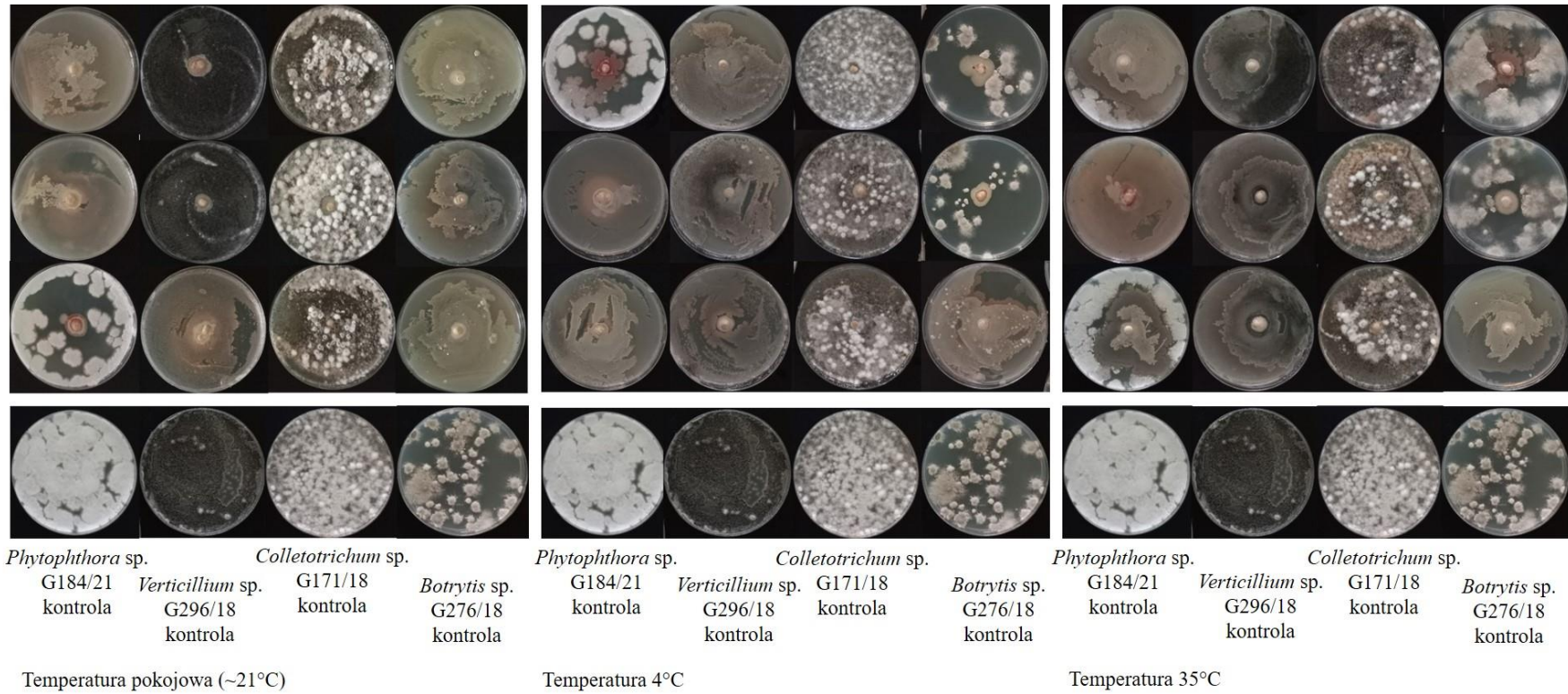
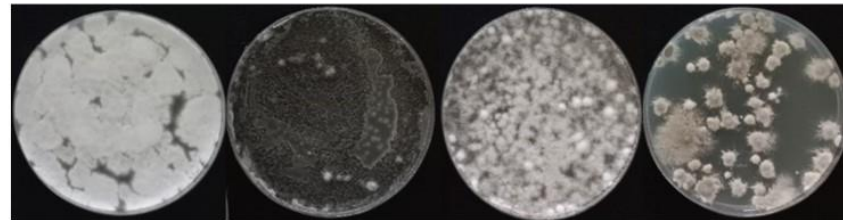
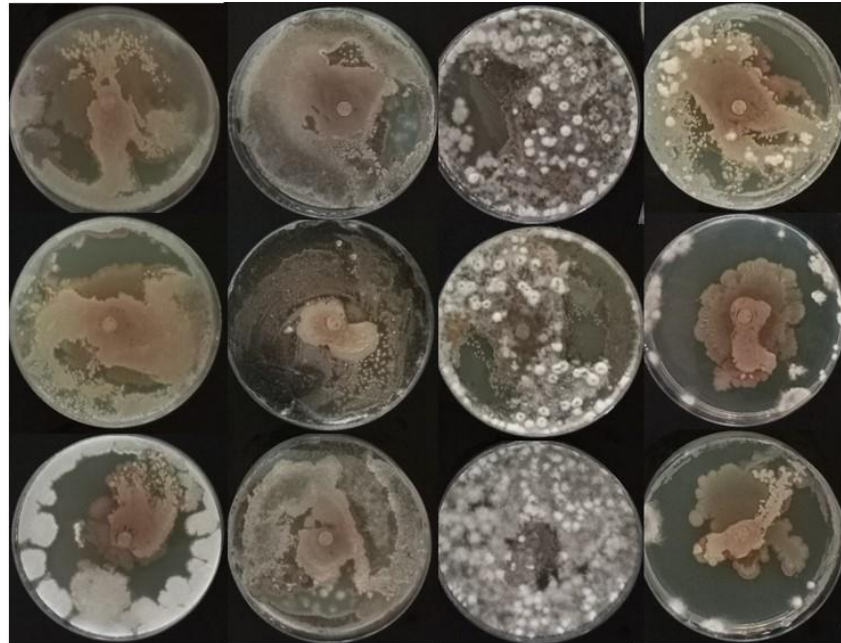
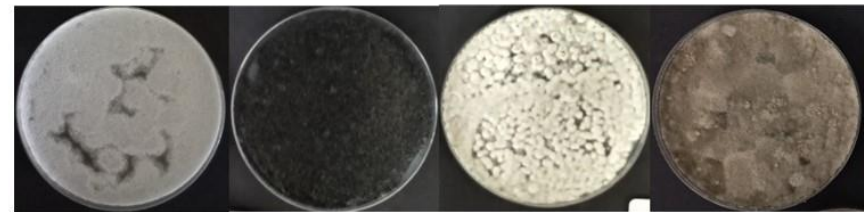
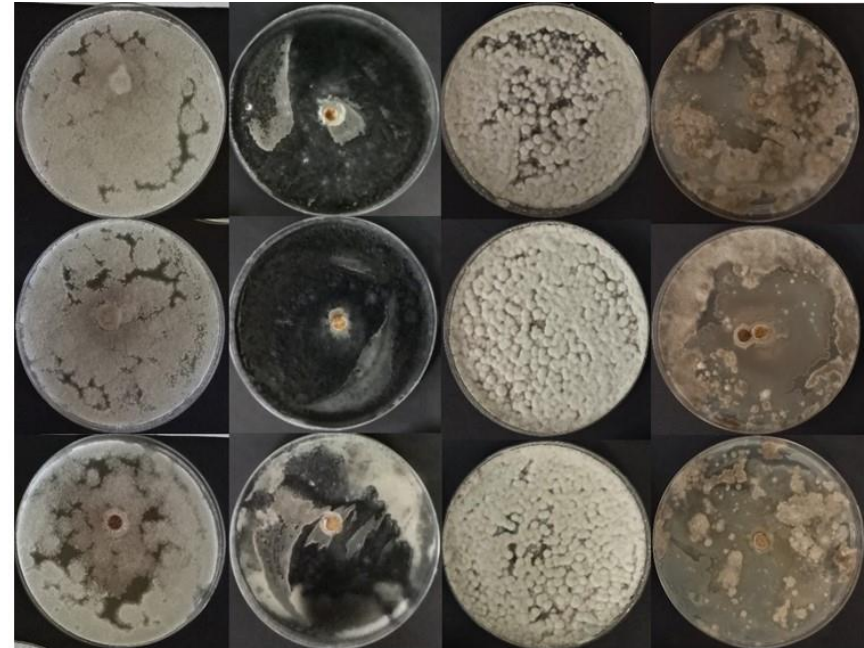


Fig. 11



Phytophthora sp. G184/21 kontrola
Verticillium sp. G296/18 kontrola
Colletotrichum sp. G171/18 kontrola
Botrytis sp. G276/18 kontrola

3 miesiące przechowywania w temperaturze pokojowej (~21°C)



Phytophthora sp. G184/21 kontrola
Verticillium sp. G296/18 kontrola
Colletotrichum sp. G171/18 kontrola
Botrytis sp. G276/18 kontrola

6 miesięcy przechowywania w temperaturze 4°C

Fig. 12

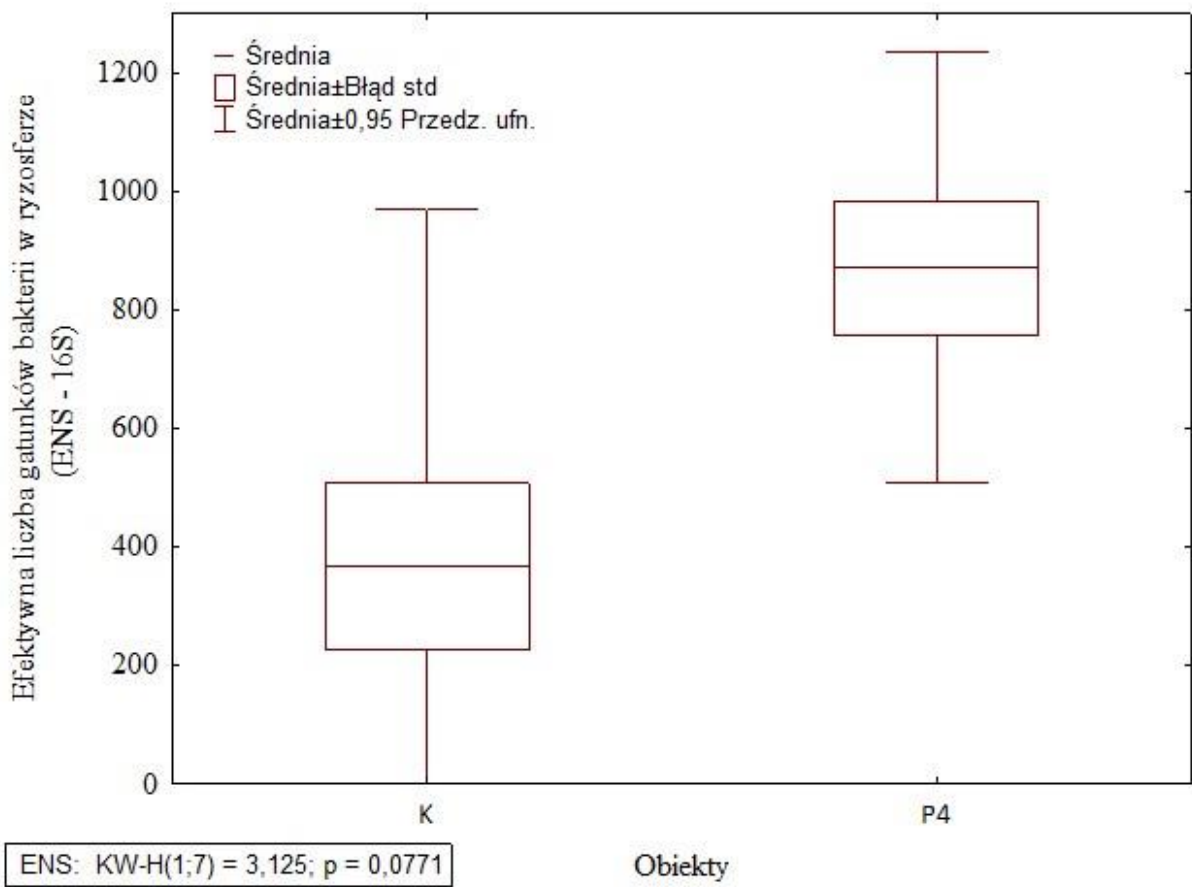


Fig. 13

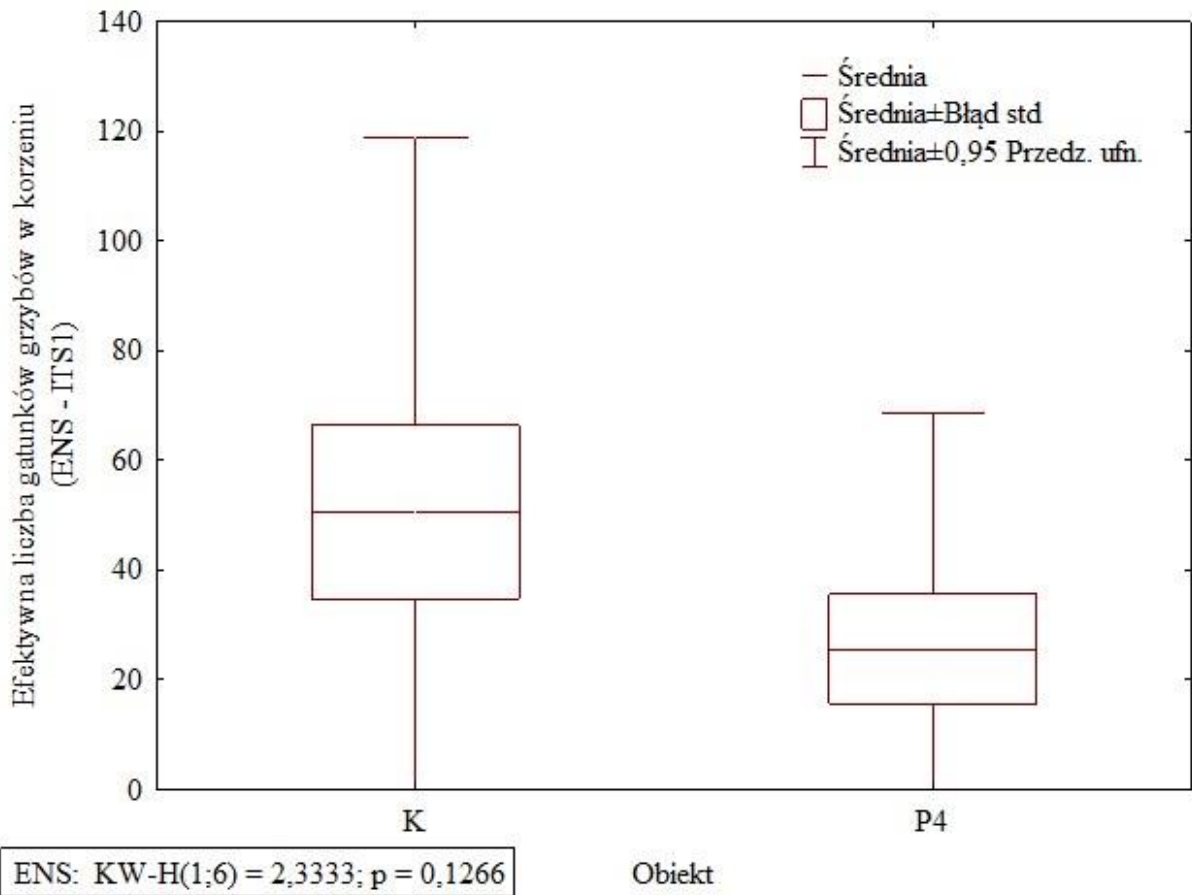


Fig. 14

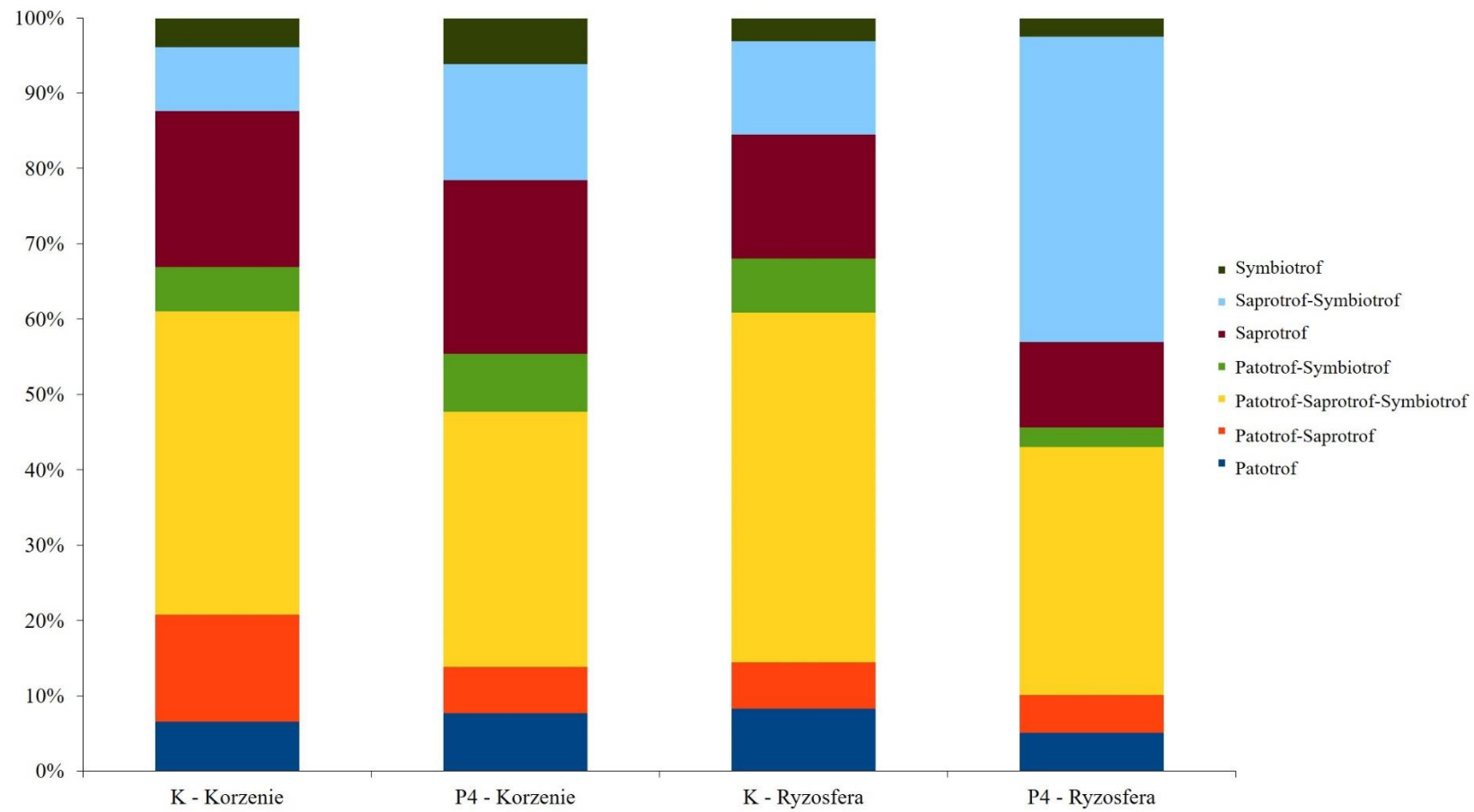


Fig. 15

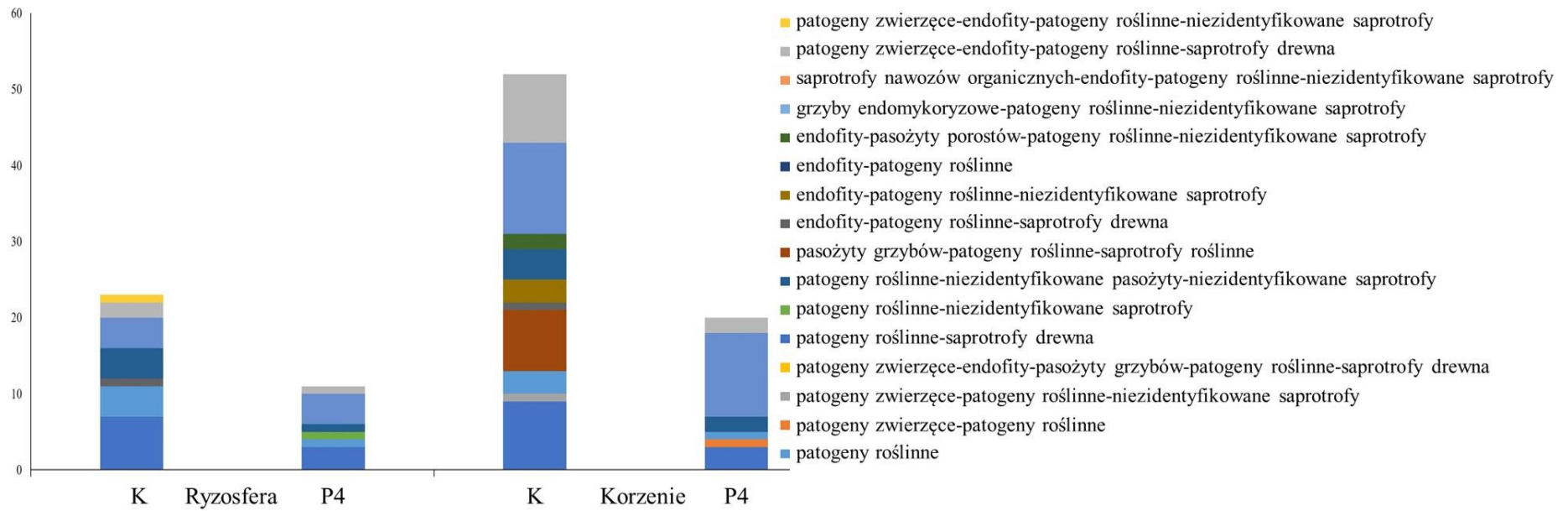


Fig. 16

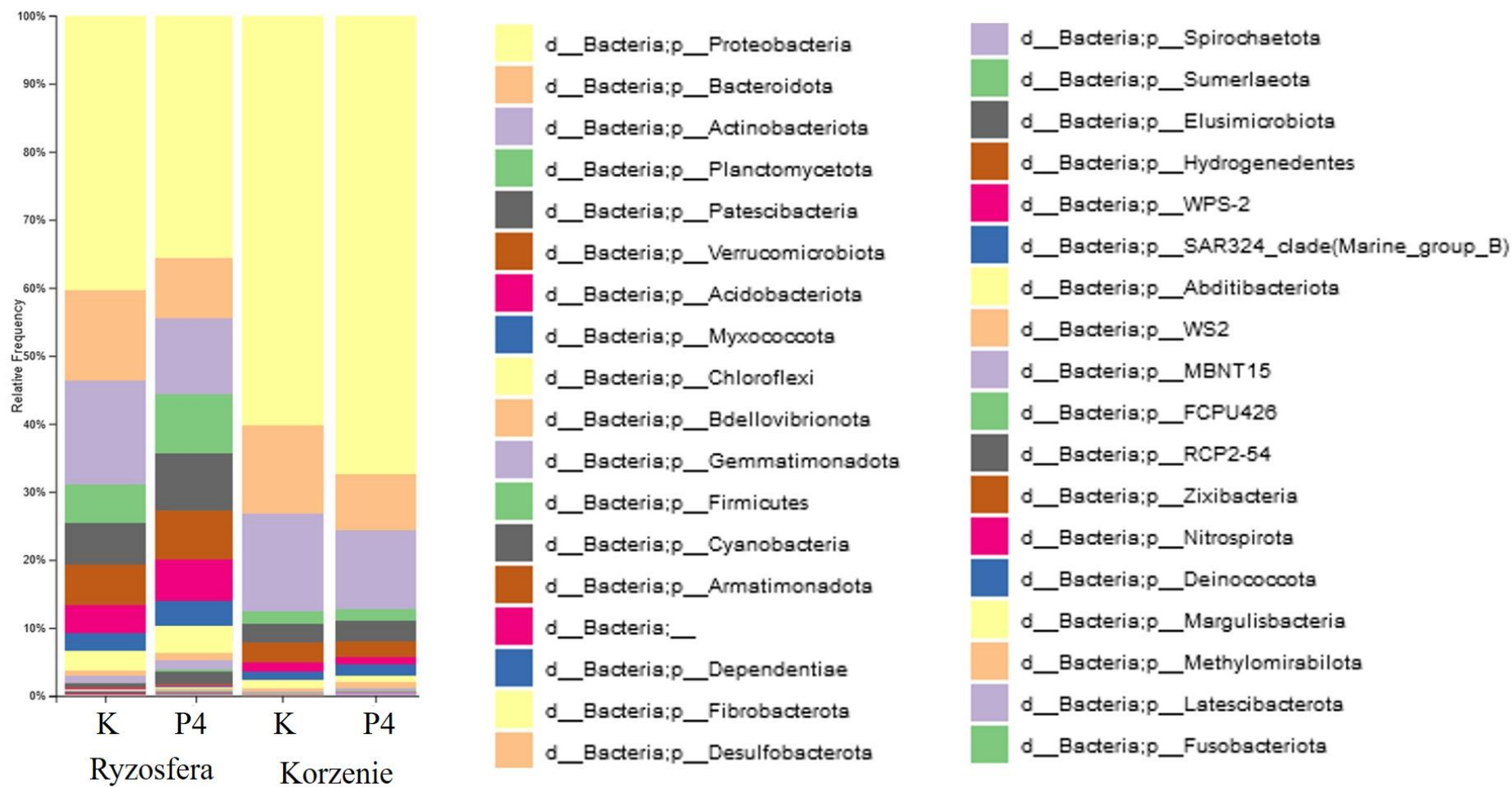


Fig. 17

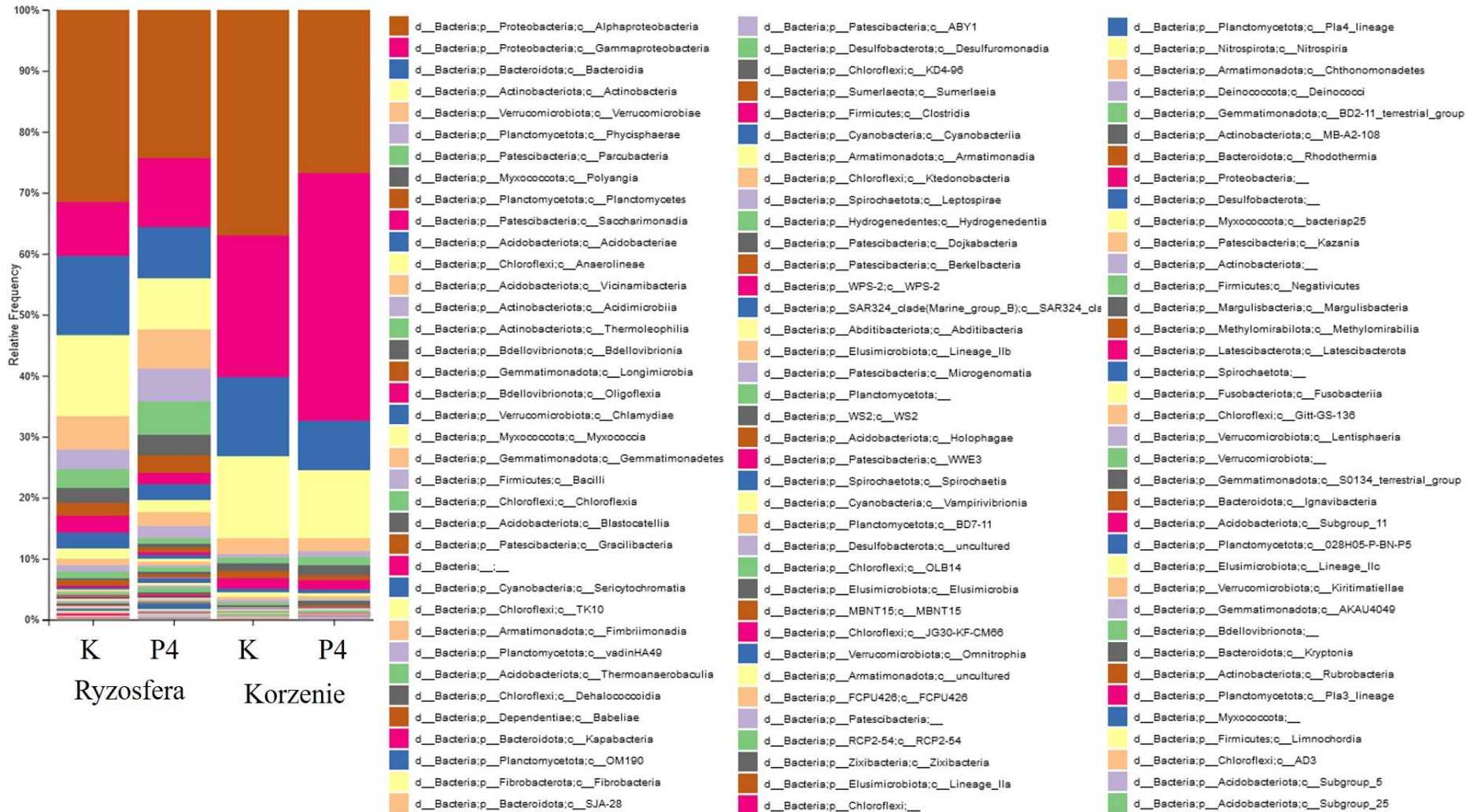


Fig. 18

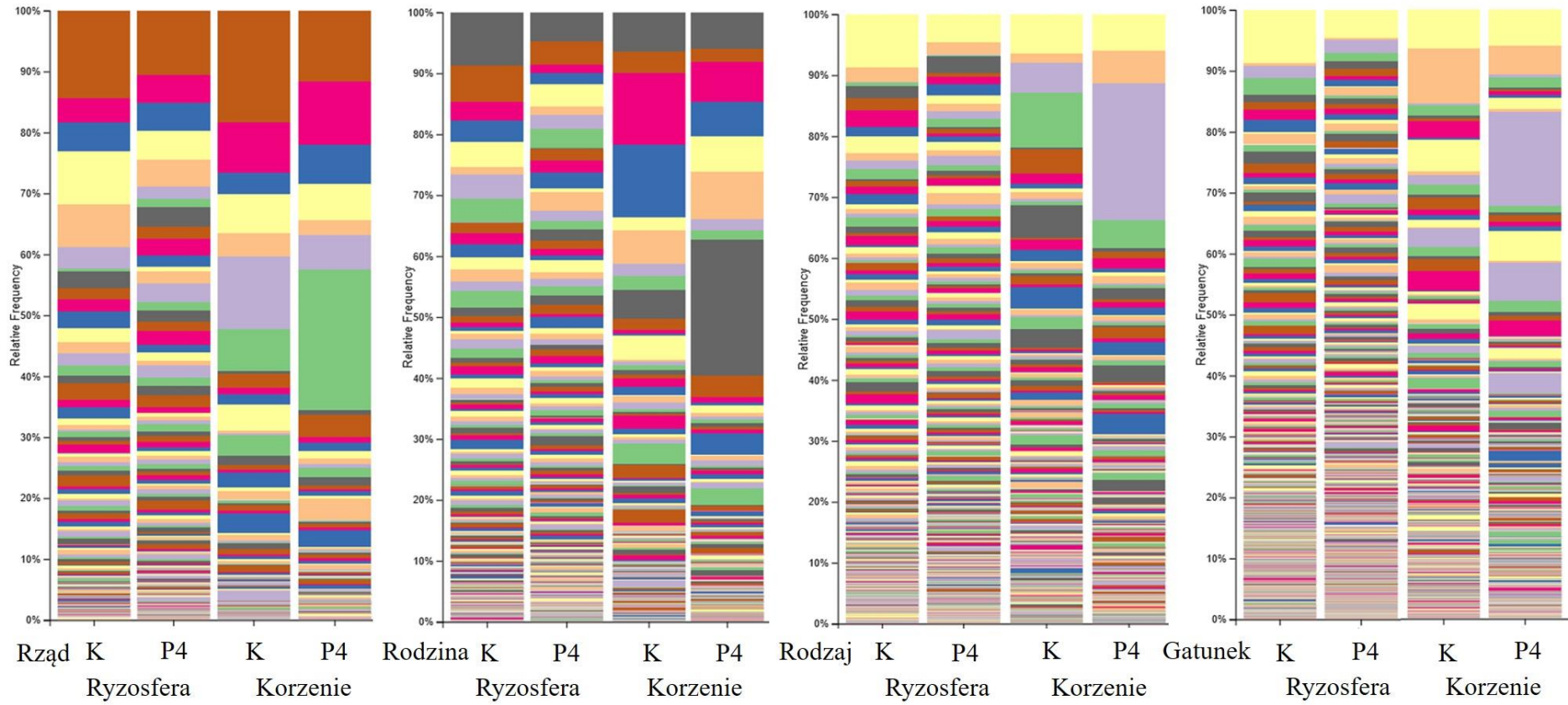


Fig. 19

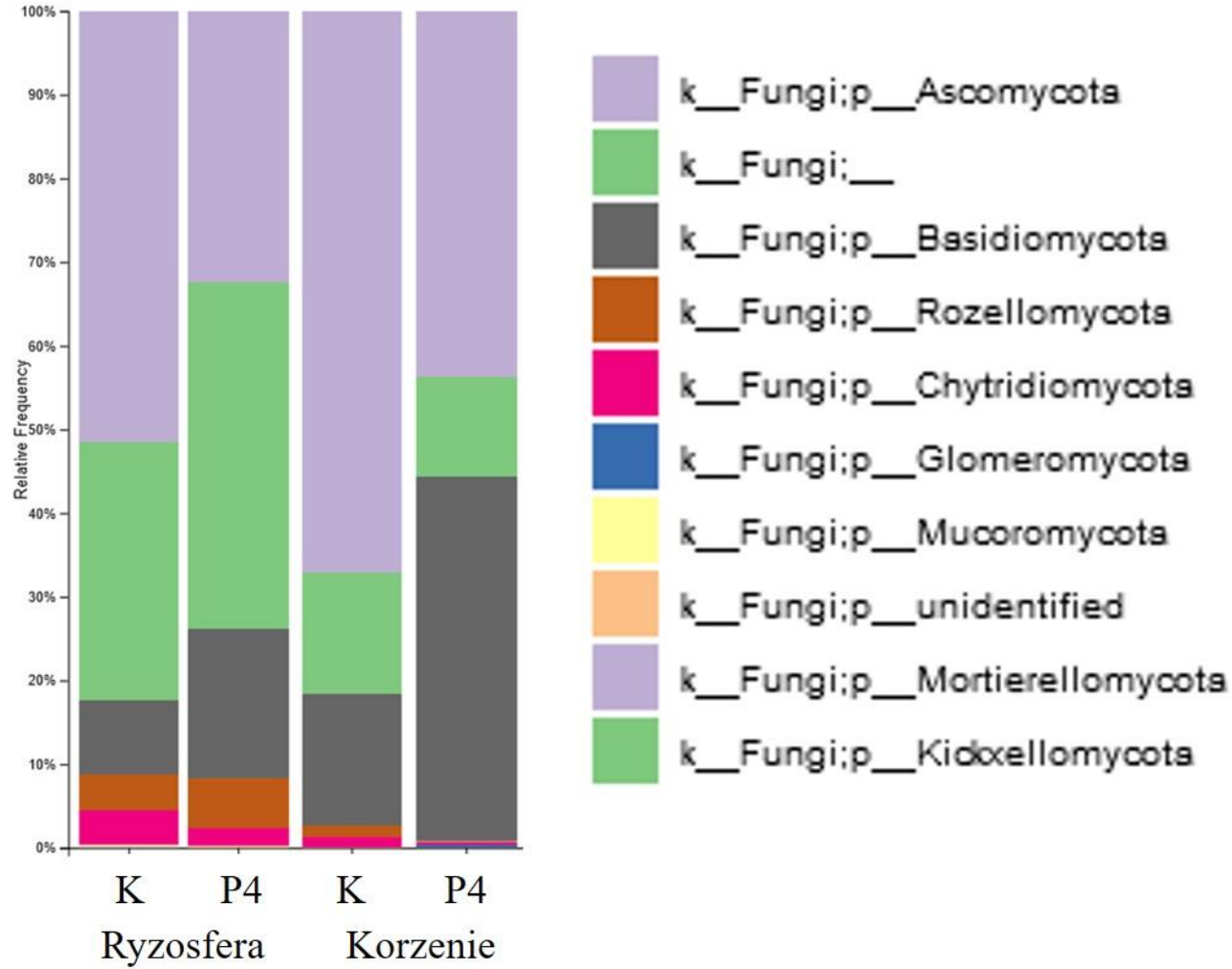


Fig. 20

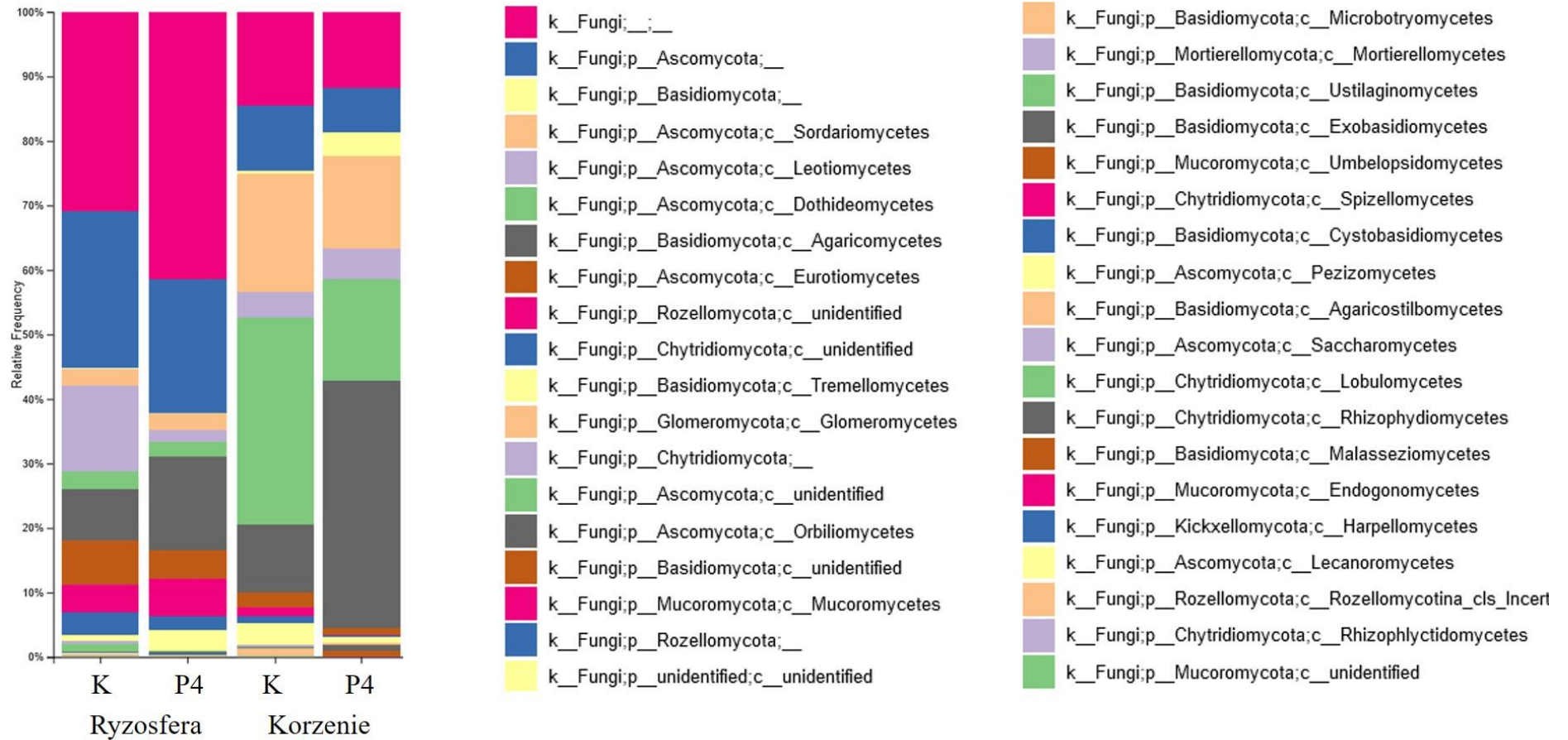


Fig. 21

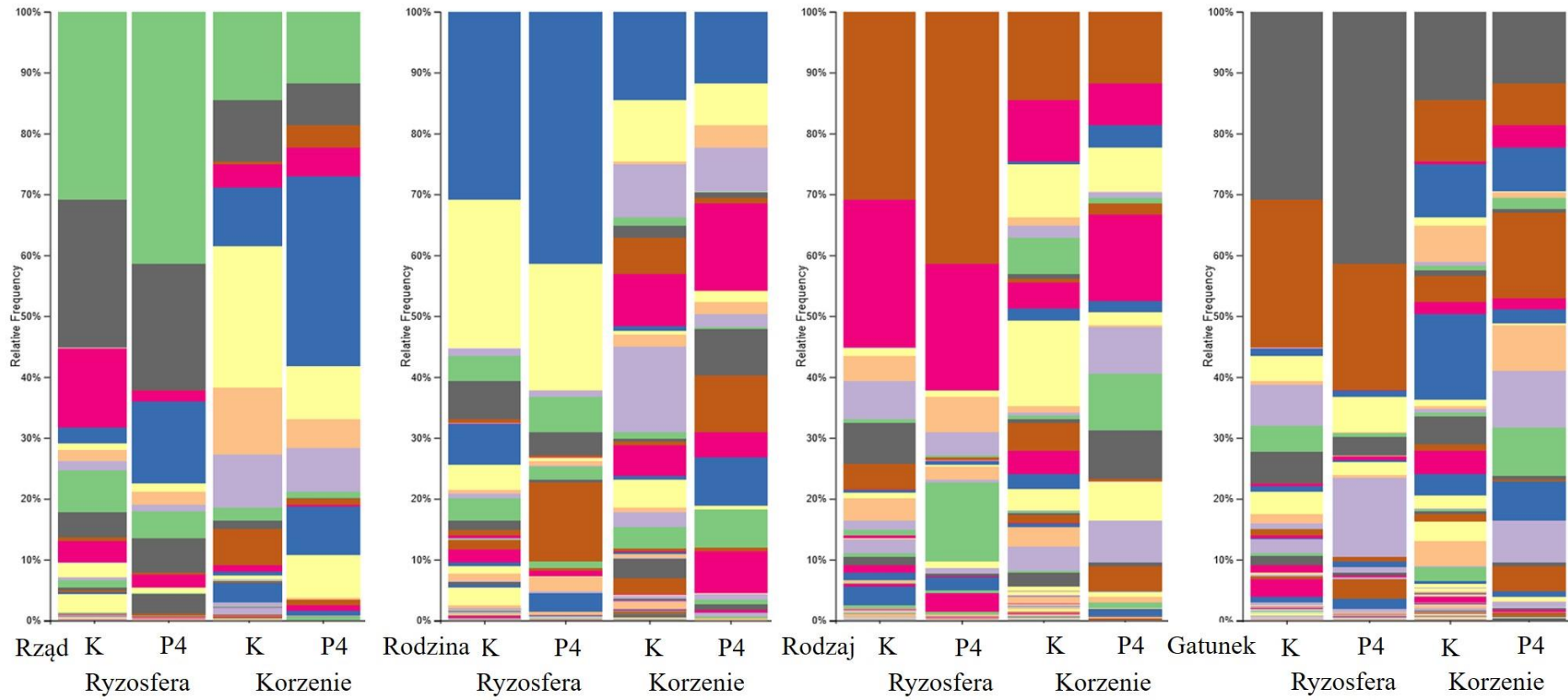
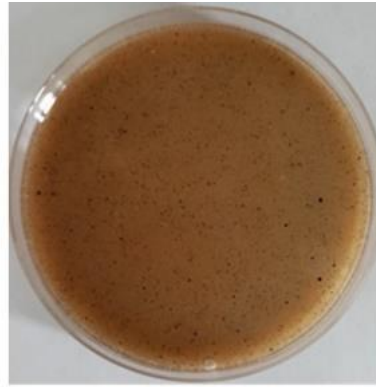


Fig. 22



a) proszek przed dodaniem wody



b) upłynniona postać żelu



c) aplikacja na korzenie



d) wygląd korzenia po aplikacji biopreparatu

Fig. 23

SKRÓT OPISU

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nawozowego produktu mikrobiologicznego i nawozowy produkt mikrobiologiczny do kondycjonowania sadzonek, utrzymania i/lub poprawy jakości mikrobiologicznej gleby, wykazujący również cechy biostymulacji roślin, pozwalający jednocześnie na kontrolę fitopatogenów w uprawie owoców miękkich oraz wykazujący wpływ na poprawę ich parametrów jakościowych, zawierający szczepy bakteryjne z rodzaju *Bacillus*. Sposób charakteryzuje się tym, że stosuje się trzy wyselekcjonowane z gleby ryzosferowej bakteryjne izolaty środowiskowe *Bacillus subtilis* AF75AB2 – sekwencja nr 1, *Bacillus* sp. AF75BC – sekwencja nr 2, *Bacillus* sp. Sp115AD – sekwencja nr 3 na liście sekwencji, które nie wykazują wzajemnego antagonistycznego działania, hodowane na podłożu namnażającym z serwatką i mikroelementami, przygotowanym na wodzie, zawieszane w płynnym nośniku organicznym albo suszone na sypkim nośniku albo liofilizowane na sypkim nośniku. Ponadto stosuje się nośnik właściwy w postaci wywaru melasowego, stanowiącego produkt uboczny w procesie fermentacji melasy, wzbogaconego suchymi kwasami humusowymi dla postaci płynnej biopreparatu albo dolomitu mikronizowanego, wzbogaconego suchymi kwasami humusowymi, mielonymi nasionami gorczycy i olejkiem goździkowym dla postaci biopreparatu suchej nierozpuszczalnej w wodzie albo maltodekstryny, wzbogaconej suchymi kwasami humusowymi, mielonymi nasionami gorczycy i olejkiem goździkowym dla postaci biopreparatu suchej rozpuszczalnej w wodzie, albo serwatki w proszku korzystnie kwaśnej neutralizowanej, wzbogaconej suchymi kwasami humusowymi, mielonymi nasionami gorczycy i gumą ksantanową dla postaci żelowej – tzn. suchej, która po zawieszeniu w wodzie tworzy żel do kondycjonowania korzeni sadzonek roślin owoców miękkich.

(26 zastrzeżeń)