

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246713 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444684**

(22) Data zgłoszenia: **2023.04.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.11.04 BUP 45/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.24 WUP 08/2025**

(51) MKP:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/41 (2006.01)

C12R 1/025 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA
I GLEBOZNAWSTWA – PAŃSTWOWY
INSTYTUT BADAWCZY, Puławy, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ANNA GAŁĄZKA, Puławy, PL
ANNA MARZEC-GRZĄDZIEL, Puławy, PL
KAROLINA GAWRYJOŁEK, Gołęb, PL
JAROSŁAW CIEPIEL, Świdnik, PL
MONIKA KOZIEŁ, Puławy, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Rożkowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Nowe szczepy bakterii, kompozycja bakteryjna i preparat mikrobiologiczny do zaprawiania nasion roślin, zwłaszcza roślin bobowatych, w tym soi (Glicine max)

PL 246713 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakterii, kompozycja bakteryjna i preparat mikrobiologiczny zawierający wyselekcjonowane szczepy bakterii do zaprawiania nasion roślin, zwłaszcza roślin bobowatych, w tym soi (*Glicine max*).

Zwiększające się zapotrzebowanie na żywność ekologiczną przy jednoczesnym zmniejszaniu się małych hodowli zwierząt wpływa na ograniczenie dostępności ekologicznych nawozów naturalnych. Dodatkowo zwiększa się w UE również popyt na żywność ekologiczną, której produkcja przekłada się na wzrost popytu na ekologiczne środki produkcji rolniczej, szczególnie bionawozy. Dostępność tradycyjnych nawozów naturalnych i organicznych (obornik, kompost) nie zapewnia odpowiedniego pokrycia potrzeb producentów żywności ekologicznej, a przez to nie zwiększa konkurencyjności upraw ekologicznych. Do zaspokojenia wymagań konsumentów i rynku niezbędne są nowe rozwiązania zapewniające bardziej efektywną produkcję żywności ekologicznej o wysokiej jakości. Jednym z takich rozwiązań jest kontrolowane stosowanie mikroorganizmów do celów nawozowych. Dlatego produkcja nawozów wzbogacanych mikrobiologicznie jest jednym z najszybciej rozwijających się segmentów rynku rolno-spożywczego.

Na rynku krajowym i zagranicznym są dostępne liczne produkty mikrobiologiczne oraz otoczko-
wane mikroorganizmami nasiona. Niestety bardzo często ich efektywność jest niska lub nie sprawdza się w warunkach gleb polskich. Bakteryjne preparaty mikrobiologiczne są szeroko wykorzystywane w praktyce rolniczej zarówno w rolnictwie ekologicznym (przy braku nawożenia mineralnego azotem), jak i w rolnictwie konwencjonalnym. Wieloletnie doświadczenie w przygotowywaniu oraz sprzedaży preparatów bakteryjnych dla roślin bobowatych, w postaci zawiesiny bakteryjnej połączonej z nośnikiem (perlit), wskazuje na stale obecne zapotrzebowanie na taki preparat. Niestety preparaty w obecnej formie przygotowywana na perlacie jako nośniku nie nadają się do wysiewu w przypadku części siewników. Większe fragmenty perlitu zatykają otwory siewnika.

Ze stanu techniki znane są badania w zakresie wpływu *A. chroococcum* na proliferację *R. leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) w inokulacie na nośniku stałym oraz na skuteczność symbiotyczną *Rlv* z roślinami grochu hodowanymi w warunkach laboratoryjnych i polowych (Martyniuk S., Kozieł M., Gałązka A. 2015. Symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* with pea plants as influenced by *Azotobacter chroococcum*. *Journal of Ecological Engineering* Vol. 16, Issue 4, 185–190). W eksperymencie laboratoryjnym stwierdzono, że proliferacja obu gatunków bakterii, *Rlv* i *A. chroococcum*, w inokulantach z podwójnej hodowli była skuteczna i że *A. chroococcum* nie miał negatywnego wpływu na rozwój ryzobiów (*Rlv*) w podłożu stałym – inokulant nośnikowy. W doświadczeniu wazonowym największą liczbę brodawek wykryto na korzeniach roślin grochu zaszczerpienych inokulantem podwójnej hodowli zawierającym *Rlv* i *A. chroococcum*, nieco mniej na korzeniach grochu zaszczerpienych monokulturowym inokulum *Rlv* i prawie żadnych brodawek nie znaleziono na korzeniach grochu niezaszczerpienego (zabieg kontrolny) bakteriami. W doświadczeniu mikropoletkowym przedsięwzięcie zaszczerpienie nasion grochu inokulantem monokulturowym *Rlv* lub inokulantem mieszanym *Rlv* i *A. chroococcum* nieznacznie zwiększyło liczbę brodawek/roślinę, strąków/roślinę i liczba nasion/strąk, w porównaniu z nieszczerpioną kontrolą, ale różnice te nie znalazły odzwierciedlenia w plonach nasion grochu/m², które były podobne we wszystkich zabiegach.

Publikacja Martyniuk S., Kozieł M., Gałązka A. 2018. Response of pulses to seed or soil application of rhizobial inoculants. *Ecological Chemistry and Engineering* S, 25(2) 323–329, przedstawia badania, w ramach których na mikropoletkach badano wzrost, powstawanie brodawek i plony nasion grochu, łubinu żółtego i soi uprawianych w glebie skolonizowanej przez duże populacje ryzobiów grochu i łubinu oraz niską populację ryzobiów soi pod wpływem nasion lub doglebowego stosowania inokulantów ryzobium. Badany sposób inokulacji nie miał istotnego wpływu na liczbę brodawek korzeniowych, wzrost roślin w fazie kwitnienia oraz na plon nasion grochu i łubinu żółtego w porównaniu z obiektami kontrolnymi bez inokulacji. W przypadku nasion soi i inokulacji gleby ryzobium soi (*Bradyrhizobium japonicum*) skutkowało istotnym wzrostem intensywności brodawkowania, świeżej i suchej masy pędów w fazie kwitnienia oraz liczebności strąków i plonu nasion soi w czasie zbioru. Soja uprawiana na poletkach, na których glebę inokulowano bakteriami symbiotycznymi, dała plon nasion o około 57% wyższy w porównaniu z soją wyhodowaną z nasion zaszczerpienych ryzobiami i o 169% wyższy niż w przypadku uprawy tej rośliny na obiekcie kontrolnym (bez posiewu) działki.

Produkowany preparat w obecnej formie jako zawiesina bakterii na perlicie wymaga od rolnika dodatkowego przygotowania i naniesienia na nasiona bezpośrednio przed wysiewem. Praktyka rolnicza zdecydowanie preferuje wysiew bezpośrednio zaprawianych nasion lub nasion otoczkowanych odpowiednim preparatem. Zatem istnieje potrzeba dostarczenia innowacyjnych preparatów i metod otoczkowania nasion, które odpowiedzą na zapotrzebowanie rynku.

Celem wynalazku jest opracowanie preparatu do zaprawiania nasion roślin, zwłaszcza roślin bobowatych takich jak soja. Dodatkowym celem wynalazku jest również dostarczenie preparatu w formie otoczki dla nasion i optymalizacja skuteczności stosowania otoczkowanych nasion w warunkach ekologicznej i konwencjonalnej uprawy roślin ze szczególnym uwzględnieniem innowacyjnych rozwiązań podnoszących żyzność i aktywność biologiczną gleb.

W doświadczeniach polowych problemem technicznym okazał się być sposób aplikacji preparatów rizobiowych (na nasiona lub doglebowo). W przypadku soi lepsze efekty uzyskano przy bezpośrednim zastosowaniu preparatu bakteryjnego na nasiona. Istotnym problemem było utrzymanie odpowiedniej ilości inokulum bezpośrednio na nasionach.

Przedmiotem wynalazku jest szczep *Rhizobium* sp. SK zdeponowany pod nr B/00471 w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM).

Przedmiotem wynalazku jest również szczep *Stenotrophomonas* sp. 1/7 zdeponowany pod nr B/00467 w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM).

Przedmiotem wynalazku jest także szczep *Achromobacter* sp. 35Bb1 zdeponowany pod nr B/00468 w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM).

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompozycja bakteryjna do zaprawiania nasion roślin, zwłaszcza roślin bobowatych, w tym soi, zawierająca szczep bakteryjny wybrany spośród: *Rhizobium* sp. SK zdeponowanego w PCM pod nr B/00471, szczep *Stenotrophomonas* sp. 1/7 zdeponowanego w PCM pod nr B/00467, szczep *Achromobacter* sp. 35Bb1 zdeponowanego w PCM pod numerem B/00468.

Korzystnie, kompozycja zawiera co najmniej dwa szczepy.

Korzystnie, kompozycja ma postać płynną lub liofilizatu.

Korzystnie, kompozycja zawiera dodatkowo składniki odżywcze, zwłaszcza aminokwasy i kwasy karboksylowe, zwłaszcza L-histydynę, L-alaninę, kwas octowy, kwas cytrynowy, kwasu mlekowy, kwas jabłkowy.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest preparat mikrobiologiczny zawierający kompozycję bakteryjną jak określono powyżej oraz składniki otoczki ziarna jak wypełniacz i lepiszcze.

Korzystnie, składniki otoczki ziarna wybrane są spośród węglanu wapnia, karboksymetylocelulozy, alginianu sodu, zmielonego torfu.

Korzystnie, wypełniacz zawiera gumę guar (20% w/v), alginian sodu (0.5% w/v), metylocelulozę (1% w/v), lepiszcze zawiera zawiesinę szczepów bakterii jak określono powyżej (20% v/w), torf (26% w/w), biowęgiel (13% w/w), chitynę (9% w/w), celulozę (26% w/w), alginian sodu (26% w/w).

Korzystnie, preparat zawiera dodatkowo składniki odżywcze.

Korzystnie, składniki odżywcze wybrane są spośród aminokwasów i kwasów karboksylowych, zwłaszcza L-histydyny, L-alaniny, kwasu octowego, kwasu cytrynowego, kwasu mlekowego, kwasu jabłkowego.

Korzystnie, liczba komórek mikroorganizmów w preparacie dla każdego szczepu wynosi co najmniej 10^8 jtk.

Korzystnie, preparat że ma postać otoczki na nasiona.

Kolejnym przedmiotem wynalazku są nasiona roślin bobowatych, zwłaszcza soi, otoczkowane kompozycją bakteryjną określoną powyżej.

Korzystnie, otoczka zawiera dodatkowo składniki odżywcze.

Korzystnie, składniki odżywcze stanowią aminokwasy i kwasy karboksylowe, zwłaszcza L-histydyna, L-alanina, kwas octowy, kwas cytrynowy, kwas mlekowy, kwas jabłkowy.

Korzystnie, składniki otoczki wybrane są spośród węglanu wapnia, karboksymetylocelulozy, alginianu sodu, zmielonego torfu.

Korzystnie, otoczka zawiera wypełniacz zawierający gumę guar (20% w/v), alginian sodu (0.5% w/v), metylocelulozę (1% w/v), lepiszcze zawierające zawiesinę szczepów bakterii wskazanych powyżej (20% v/w), torf (26% w/w), biowęgiel (13% w/w), chitynę (9% w/w), celulozę (26% w/w), alginian sodu (26% w/w).

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji bakteryjnej określonej powyżej do zaprawiania nasion roślin, zwłaszcza nasion roślin bobowatych, w tym soi.

Korzystnie, nasiona są otoczkowane.

Przygotowany preparat mikrobiologiczny jest w formie otoczki do nasion i zawiera bakterie brodawkowe oraz inne bakterie z grupy PGPR. Dany preparat to otoczka zawierająca bakterie z rodziny *Rhizobiium* (*Bradyrhizobium japonicum*), *Stenotrophomonas* oraz *Achromobacter* oraz dodatkowe składniki odżywcze (aminokwasy: L-alanina oraz L-histydyna; kwasy karboksylowe: m.in.: kwas L-mlekowy, kwas cytrynowy, kwas L-jabłkowy, kwas octowy). Odpowiednio dobrany skład otoczki stanowi gotowy produkt do zastosowania w skali półtechnicznej i technicznej.

W ramach optymalizacji działania preparatu zostało zastosowane otoczkowanie nasion roślin bobowatych. Zabieg ten w znaczący sposób wpływa na skuteczność preparatów. Zastosowanie otoczki bezpośrednio na nasiona zawierającej komponent mikrobiologiczny może istotnie zwiększyć biodostępność bakterii dla rośliny (już od pierwszych etapów jej wzrostu, czyli kiełkowania) oraz jednocześnie ochronić obecne w otoczkach bakterie brodawkowe przed patogenicznym działaniem innych mikroorganizmów w glebie (zapewni to obecność w otoczkach dodatkowych komponentów). W skład otoczki oprócz wymienionych powyżej bakterii, kwasów karboksylowych oraz aminokwasów mogą wchodzić także węglan wapnia, karboksymetyloceluloza, alginian sodu, zmielony torf.

Opracowana technologia w formie otoczkowanych nasion (konsorcja mikroorganizmów) stanowi cenne źródło bionawozów służących poprawie jakości gleby oraz wzrostu i plonowania roślin bobowatych.

Innowacyjność produktu polega na wyselekcjonowaniu najefektywniejszych, autochtonicznych szczepów bakteryjnych z rodzimych roślin uprawnych i zastosowaniu ich w jednej szczepionce wraz z wybranymi bakteriami PGPR w formie otoczki nasion.

W ramach opracowania wynalazku przeprowadzono doświadczenia doniczkowe w komorach wzrostu roślin w warunkach *in vitro* mające na celu wybór najbardziej efektywnych mikroorganizmów dla wybranej rośliny. Doświadczenia przeprowadzono na trzech modelach roślinnych (soja, groch i łubin). Każda z roślin została poddana działaniu mikroorganizmów symbiotycznych. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w niezależnych powtórzeniach biologicznych. Kontrolę ujemną stanowiły rośliny niepoddane działaniu mikroorganizmów. Po zakończeniu doświadczenia zmierzono masę roślin oraz policzono brodawki korzeniowe. Wyniki poddano analizie statystycznej, która pozwoliła na wybranie najefektywniejszych kombinacji, z których 3 zostały wybrane do dalszych analiz. Wykonano także analizę genetyczną i fenotypową wybranych szczepów mikroorganizmów z wykorzystaniem klasycznych metod mikrobiologii oraz nowoczesnych technik opartych na mikromacierzach.

Następnie dokonano wyboru optymalnych warunków wzrostu badanych mikroorganizmów w celu zwiększenia wydajności ich namnażania. Analizie poddano zdolności poszczególnych mikroorganizmów do wzrostu w wybranych warunkach środowiskowych, w tym w warunkach stresu, oraz zdolność do asymilacji różnych źródeł węgla, azotu, siarki. Analiza ta pozwoliła także na znalezienie warunków najwydajniejszego wzrostu danego mikroorganizmu, co jest kluczowe w dalszych etapach. Wyniki tych analiz są podstawą do stworzenia procedury namnażania tych mikroorganizmów w skali półtechnicznej. Ponadto do dalszych analiz wytypowano trzy najefektywniejsze kombinacje roślina – mikroorganizm (*Rhizobium* sp. SK + PGPR (Szczep *Stenotrophomonas* sp. 1/7 + Szczep *Achromobacter* sp. 35BB1). Wybrane szczepy PGPR zostały następnie poddane analizie genetycznej przeprowadzonej z wykorzystaniem technik sekwencjonowania nowej generacji (pełny genom).

Przygotowanie doświadczenia w warunkach *in vitro* pozwoliło na wybór najbardziej efektywnych mikroorganizmów dla wybranej rośliny. Analiza genetyczna i fenotypowa wybranych szczepów mikroorganizmów pozwoliła na prawidłowe przyporządkowanie mikroorganizmu do gatunku oraz określenie zdolności do wzrostu w wybranych warunkach środowiskowych. Wybór optymalnych warunków wzrostu badanych mikroorganizmów w celu zwiększenia wydajności ich namnażania jest kluczowy w przebiegu doświadczenia, wyniki tych analiz są podstawą do ewentualnego stworzenia procedury namnażania tych mikroorganizmów w skali półtechnicznej oraz technicznej w przyszłości. Wybór składowych otoczki pozwolił na określenie kombinacji, które wykazują najwyższą prze-

żywalność mikroorganizmów, nasiona otoczkowane zostały poddane testom kiełkowania w warunkach *in vitro*. Ostatnim etapem jest analiza skuteczności wybranych metod w doświadczeniu wazowym.

Szczep *Rhizobium* sp. Sk został pierwotnie wyizolowany z brodawek korzeniowych soi (*Glycine*). Wykazuje on wysokie działanie symbiotyczne względem roślin bobowatych korzeniowych, co w rezultacie pozwala na otrzymywanie statystycznie większej biomasy roślinnej. Szczep jest trwały i stabilny, nie wykazuje zmian fenotypowych i w efektywności symbiotycznej po wielokrotnym pasażowaniu. Szczep jest szybkorosnący, co ułatwia jego wykorzystanie jako składnika preparatów mikrobiologicznych (brak konieczności wydłużania procesu produkcji). Wykazuje wysoką przeżywalność w procesie liofilizacji, co umożliwia jego długotrwałe przechowywanie. Warunki liofilizacji: (1) -30°C/24 h, (2) -10°C/12 h, (3) +20°C/12 h. Czas liofilizacji może wymagać wydłużenia przy zastosowaniu większej objętości hodowli.

Szczep *Stenotrophomonas* sp. 1/7 został pierwotnie wyizolowany ze strefy ryzosferowej korzeni kukurydzy (*Zea* sp.). Udowodniono, że inokulacja tym szczepem wpływa pozytywnie na wzrost i rozwój roślin, co w rezultacie pozwala na otrzymanie statystycznie większej biomasy roślinnej. Szczep jest trwały i stabilny, nie wykazuje zmian fenotypowych i efektywności promowania wzrostu i rozwoju roślin po wielokrotnym pasażowaniu. Szczep jest szybkorosnący, co ułatwia jego wykorzystywanie jako składnika preparatów mikrobiologicznych (brak konieczności wydłużania procesu produkcji). Wykazuje wysoką przeżywalność w procesie liofilizacji, co umożliwia jego długotrwałe przechowywanie. Warunki liofilizacji: (1) -30°C/24 h, (2) -10°C/12 h, (3) +20°C/12 h. Czas liofilizacji może wymagać wydłużenia przy zastosowaniu większej objętości hodowli.

Szczep *Achromobacter* sp. 35Bb1 został pierwotnie wyizolowany ze strefy ryzosferowej korzeni kukurydzy (*Zea* sp.). Udowodniono, że inokulacja tym szczepem wpływa pozytywnie na wzrost i rozwój roślin, co w rezultacie pozwala na otrzymanie statystycznie większej biomasy roślinnej. Szczep jest trwały i stabilny, nie wykazuje zmian fenotypowych i efektywności promowania wzrostu i rozwoju roślin po wielokrotnym pasażowaniu. Szczep jest szybkorosnący, co ułatwia jego wykorzystywanie jako składnika preparatów mikrobiologicznych (brak konieczności wydłużania procesu produkcji). Wykazuje wysoką przeżywalność w procesie liofilizacji, co umożliwia jego długotrwałe przechowywanie. Warunki liofilizacji: (1) -30°C/24 h, (2) -10°C/12 h, (3) +20°C/12 h. Czas liofilizacji może wymagać wydłużenia przy zastosowaniu większej objętości hodowli.

Zastosowanie w uprawie preparatu poprawiającego wzrost i plonowanie roślin oraz wpływającego korzystnie na żyzność i aktywność biologiczną gleby naturalnie zwiększą potencjał biologiczny gleb, w tym ich zasobność w składniki mineralne i materię organiczną.

Fig. 1 Schemat technologiczny

Fig. 2 Wzrost soi po zastosowaniu szczepienia nasion preparatem w porównaniu do kontroli.

Przykład 1

Czyste hodowle bakteryjne szczepów *Rhizobium* sp. Sk, *Stenotrophomonas* sp. 1/7, *Achromobacter* sp. 35Bb1 przygotowano przez zaszczepienia jałowego podłoża LB. Hodowle wytrąsano przez 48 h (*Stenotrophomonas* sp. 1/7, *Achromobacter* sp. 35Bb1), oraz 96 h (*Rhizobium* sp. Sk), w temperaturze 28°C. Uzyskane hodowle odwirowywano (8000 rpm, 5 minut), uzyskany osad zawieszano w roztworze soli fizjologicznej. Podłoże w postaci piasku poddano procesowi sterylizacji (121°C, 20 minut). Do doniczek naważono 0,5 kg podłoża i nawadniano do 60% wilgotności. Nasiona soi poddano sterylizacji powierzchniowej (H₂O₂, woda destylowana). Nasiona naniesiono na jałowe szalki Petriego wypełnione jałową gazą i umieszczono w temperaturze 25°C, do momentu aktywacji zarodka i wypuszczenia siewki. Otrzymane wykiełkowane nasiona przenoszono do doniczek i bezpośrednio zaszczepiano zawiesiną bakteryjną składającą się ze szczepu *Rhizobium* sp. Sk oraz *Stenotrophomonas* sp. 1/7 lub *Achromobacter* sp. 35Bb1 (każdy w odpowiedniej objętości zawierającej 10⁸ jtk). Doświadczenie prowadzono przez sześć tygodni w komorze klimatyzacyjnej, w trzech powtórzeniach, przy 16 godzinnym oświetleniu, przy nasileniu światła 240 E·m⁻¹·s⁻¹. Rośliny hodowano w temperaturze 24°C w dzień oraz przez 8 godzin w nocy w temperaturze 18°C. Rośliny były podlewane wodą destylowaną w odstępach 48 h. Raz na 7 dni stosowano podłoże Jensena w celu dostarczenia niezbędnych substancji mineralnych. Doświadczenie prowadzono przez 6 tygodni. Po tym czasie rośliny usunięto z doniczek, obliczono ich świeżą masę i określono liczbę brodawek korzeniowych. Wyniki odnoszono do kontroli ujemnej doświadczenia (NTC), którą stanowiły rośliny niezaszczepione analizowanymi bakteriami.

Uzyskano następujące wyniki:

Masa roślin [g]		
NTC	<i>Rhizobium</i> sp. Sk, <i>Stenotrophomonas</i> sp. 1/7	<i>Rhizobium</i> sp. Sk, <i>Achromobacter</i> sp. 35Bb1
3.399	3.798	3.757
Liczba brodawek korzeniowych		
NTC	<i>Rhizobium</i> sp. G_P, <i>Stenotrophomonas</i> sp. 1/7	<i>Rhizobium</i> sp. G_P, <i>Achromobacter</i> sp. 35Bb1
0	16.556	20.111

Uzyskano statystycznie istotny wzrost świeżej masy roślin po zastosowaniu badanych szczepów bakteryjnych.

Skład pożywki Jensena: 1 g CaHPO₄, 0.2 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄ x 7H₂O, 0.2 g NaCl, 1 g FeCl₃ x 6H₂O, 1 ml roztwór mikroelementów, 1000 ml woda destylowana (roztwór mikroelementów: 0.268 g H₃BO₃, 0.153 g MnSO₄ x H₂O, 0.022 g ZnSO₄ x 7H₂O, 0.012 g Na₂MoO₄ x 2H₂O, 0.0075 g CuSO₄ x 5H₂O, 100 ml woda destylowana).

Wszystkie trzy szczepy nie wykazują antagonizmu wobec siebie i mogą być użyte w jednym preparacie co potwierdzono w badaniach laboratoryjnych.

Wykonano na płytkach Petriego na podłożu LB testy antytoksyczności trzech badanych szczepów bakteryjnych. Nie wykazano antagonizmu szczepów wobec siebie, co potwierdza ich użycie w konsorcjum.

Przykład 2. Otrzymywanie otoczkowanych nasion soi

Czyste hodowle bakteryjne szczepów *Rhizobium* sp. Sk, *Stenotrophomonas* sp. 1/7, *Achromobacter* sp. 35Bb1 przygotowano przez zaszczepienia jałowego podłoża LB. Hodowle wytrząsano przez 48 h (*Stenotrophomonas* sp. 1/7, *Achromobacter* sp. 35Bb1), oraz 96 h (*Rhizobium* sp. Sk), w temperaturze 28°C. Określono liczebność bakterii i rozcieńczono do 7,4 x 10⁶. Uzyskane hodowle odwirowywano (8000 rpm, 5 minut), uzyskany osad zawieszano w roztworze soli fizjologicznej. Do przygotowania otoczki wykorzystano mieszaninę lepiszcza oraz wypełniacza. Ilości poszczególnych składników przeliczono na 100 g nasion. W skład lepiszcza (80 ml) wchodziły: guma guar (20% w/v), sól sodowa kwasu alginowego (0.5% w/v), metyloceluloza (1% w/v). W skład wypełniacza (40 g) wchodziły: zawiesina zawierająca 7,4 x 10⁶ poszczególnych bakterii (20% v/w), torf (26% w/w), biowęgiel (13% w/w), chityna (9% w/w), celuloza (26% w/w), sól sodowa kwasu alginowego (26% w/w). Lepiszczce oraz wypełniacz podzielono na 3 części. Na suche nasiona nanoszono naprzemiennie kolejne części wymienionych mieszanin, zaczynając od lepiszcza. Jako warstwę wykończenia i utrwalenia otoczek stosowano mieszaninę węglanu wapnia oraz metylocelulozy (1:1) (25 g na 100 g nasion). Tak uzyskane nasiona suszono w temperaturze pokojowej. Na podstawie przeprowadzonych analiz laboratoryjnych (testy metaboliczne dla zastosowanych szczepów) wykazano, że dodatek takich składników jak L-alanina, L-histydyna, kwas L-mlekowy, kwas cytrynowy, kwas L-jabłkowy, lub kwas octowy, może pozytywnie wpłynąć na ostateczny produkt.

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep *Rhizobium* sp. SK zdeponowany pod nr B/00471 w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM).
2. Szczep *Stenotrophomonas* sp. 1/7 zdeponowany pod nr B/00467 w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM).

3. Szczep *Achromobacter* sp. 35Bb1 zdeponowany pod nr B/00468 w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM).
4. Kompozycja bakteryjna do zaprawiania nasion roślin, zwłaszcza roślin bobowatych, w tym soi, **znamienna tym**, że zawiera szczep bakteryjny wybrany spośród: *Rhizobium* sp. SK zdeponowanego w PCM pod nr B/00471, szczep *Stenotrophomonas* sp. 1/7 zdeponowanego w PCM pod nr B/00467, szczep *Achromobacter* sp. 35Bb1 zdeponowanego w PCM pod numerem B/00468.
5. Kompozycja bakteryjna według zastrz. 4, **znamienna tym**, że zawiera co najmniej dwa szczepy.
6. Kompozycja bakteryjna według zastrz. 4 albo 5, **znamienna tym**, że ma postać płynną lub liofilizatu.
7. Kompozycja bakteryjna według jednego z zastrz. 4–6, **znamienna tym**, że zawiera dodatkowo składniki odżywcze, zwłaszcza aminokwasy i kwasy karboksylowe, zwłaszcza L-histydynę, L-alaninę, kwas octowy, kwas cytrynowy, kwasu mlekowy, kwas jabłkowy.
8. Preparat mikrobiologiczny zawierający kompozycję bakteryjną jak określono w jednym z zastrz. 4 albo 5 oraz składniki otoczki ziarna jak wypełniacz i lepiszcze.
9. Preparat mikrobiologiczny według zastrz. 8, **znamienny tym**, że składniki otoczki ziarna wybrane są spośród węglanu wapnia, karboksymetylocelulozy, alginianu sodu, zmielonego torfu.
10. Preparat mikrobiologiczny według zastrz. 8, **znamienny tym**, że wypełniacz zawiera gumę guar (20% w/v), alginian sodu (0.5% w/v), metylocelulozę (1% w/v), lepiszcze zawiera zawiesinę szczepów bakterii jak określono w zastrz. 1–3 (20% v/w), torf (26% w/w), biowęgiel (13% w/w), chitynę (9% w/w), celulozę (26% w/w), alginian sodu (26% w/w).
11. Preparat mikrobiologiczny według jednego z zastrz. 8–10, **znamienny tym**, że zawiera dodatkowo składniki odżywcze.
12. Preparat mikrobiologiczny według zastrz. 11, **znamienny tym**, że składniki odżywcze wybrane są spośród aminokwasów i kwasów karboksylowych, zwłaszcza L-histydyny, L-alaniny, kwasu octowego, kwasu cytrynowego, kwasu mlekowego, kwasu jabłkowego.
13. Preparat mikrobiologiczny, według jednego z zastrz. 8–12, **znamienny tym**, że liczba komórek mikroorganizmów w preparacie dla każdego szczepu wynosi co najmniej 10^8 jtk.
14. Preparat mikrobiologiczny według jednego z zastrz. 8–13, **znamienny tym**, że ma postać otoczki na nasiona.
15. Nasiona roślin bobowatych, zwłaszcza soi, otoczkowane kompozycją bakteryjną jak określono w zastrz. 4 albo 5.
16. Nasiona roślin bobowatych, według zastrz. 15, **znamiennie tym**, że otoczka zawiera dodatkowo składniki odżywcze.
17. Nasiona roślin bobowatych według zastrz. 16, **znamiennie tym**, że składniki odżywcze stanowią aminokwasy i kwasy karboksylowe, zwłaszcza L-histydyna, L-alanina, kwas octowy, kwas cytrynowy, kwas mlekowy, kwas jabłkowy.
18. Nasiona roślin bobowatych według zastrz. 15, **znamiennie tym**, że składniki otoczki wybrane są spośród węglanu wapnia, karboksymetylocelulozy, alginianu sodu, zmielonego torfu.
19. Nasiona roślin bobowatych według zastrz. 15, **znamiennie tym**, że zawierają wypełniacz zawierający gumę guar (20% w/v), alginian sodu (0.5% w/v), metylocelulozę (1% w/v), lepiszcze zawierające zawiesinę szczepów bakterii jak określono w zastrz. 1–3 (20% v/w), torf (26% w/w), biowęgiel (13% w/w), chitynę (9% w/w), celulozę (26% w/w), alginian sodu (26% w/w).
20. Zastosowanie kompozycji bakteryjnej jak określono w zastrz. 4 albo 5 do zaprawiania nasion roślin, zwłaszcza nasion roślin bobowatych, w tym soi.
21. Zastosowanie według zastrz. 20, **znamiennie tym**, że nasiona są otoczkowane.

Rysunki

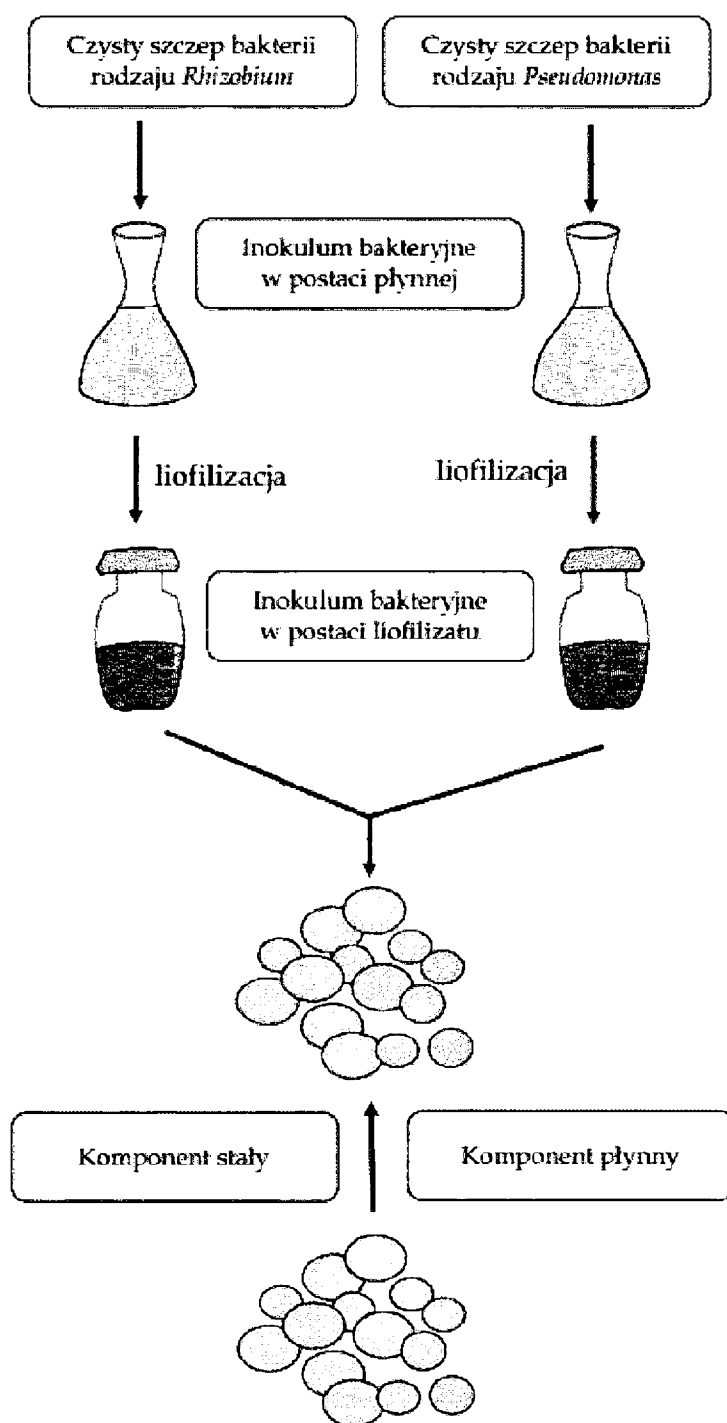


Fig. 1

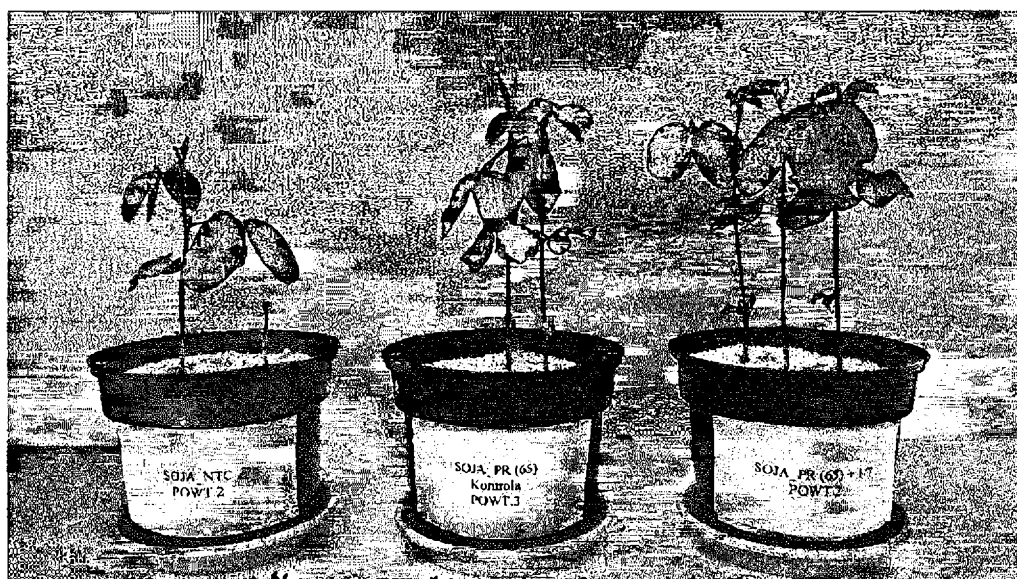


Fig. 2