

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 245369 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441772**

(22) Data zgłoszenia: **2022.07.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.01.22 BUP 04/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.07.08 WUP 28/2024**

(51) MKP:

A01N 63/22 (2020.01)

C12P 1/04 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL
SIEĆ BADAWCZA ŁUKASIEWICZ – ŁÓDZKI
INSTYTUT TECHNOLOGICZNY, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

OLGA MARCHUT-MIKOŁAJCZYK,
Moszczenica, PL
PIOTR DROŹDŻYŃSKI, Zgierz, PL
KATARZYNA STRUSZCZYK-ŚWITA,
Rosanów, PL
MARIA WIŚNIEWSKA-WRONA, Łódź, PL
KLAUDIA PIEKARSKA, Łódź, PL
WIESŁAW ADAMIEC, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Westrych, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania biologicznego preparatu do stymulacji wzrostu i ochrony roślin

PL 245369 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biologicznego preparatu do stymulacji wzrostu i ochrony roślin.

Opracowane preparaty związków biologicznie aktywnych, stosowane będą w formie oprysku, ale też jako preparaty dogłębowe. Działanie wytworzonych biopreparatów skutkuje: zredukowaniem liczby organizmów szkodliwych dla roślin, zwiększeniem liczebności mikroorganizmów wytwarzających enzymy chitynolityczne odpowiedzialne za hamowanie wzrostu patogenów glebowych (grzybów) oraz promocją wzrostu biomasy roślinnej.

Z czasopisma (Fang Zheng, Lei Chen, Peifeng Zhang, Jingqi Zhou, Xiaofang Lu, Wei Tian, Carbohydrate polymers exhibit great potential as effective elicitors in organic agriculture: A review, Carbohydrate Polymers Volume 230, 15 February 2020, 115637) wiadomo, że poliaminosacharydy wzbudzają odporność roślin na patogen, a oprócz tego mogą bezpośrednio ograniczać wzrost grzybów fitopatogennych.

Chitozan, polimer o ładunku dodatnim, podany roślinie z zewnątrz reaguje z ujemnie naładowanymi molekułami na powierzchni komórki grzyba i wchodzi w reakcje z określonymi obszarami aktywnymi, co powoduje istotne zmiany w kompozycji membrany patogena. Chitozan oddziałuje również bezpośrednio na grzyby, hamując ich wzrost. Właściwości chitozanu jako czynnika promującego wzrost roślin opisano między innymi w czasopismach: PCACD, Monograph of Polish Chitin Society, vol. V, 43–48 (1999); Prace Naukowe Inst. Tech. Org. Politech. Wrocławskiej, 472–473 (1995); Mar. Drugs 8, 968–987, (2010); Progress in Plant Protection 52(4), (2012); Agron. Sustain. Dev. 35:569–588 (2015).

Z opisu patentowego PL 189890 znany jest preparat zawierający chitozan stosowany do ochrony roślin przed chorobami.

Biosurfaktanty to biologiczne związki powierzchniowo czynne (głównie pochodzenia mikrobiologicznego) o budowie amfifilowej, charakteryzujące się wieloma unikatowymi zdolnościami, między innymi obniżania napięcia międzyfazowego i powierzchniowego. Wśród unikalnych właściwości tych związków znana jest też aktywność promowania wzrostu roślin. Z literatury [Olga Marchut-Mikołajczyk, Piotr Drożdżyński, Dominika Pietrzyk, Tadeusz Antczak, Biosurfactant production and hydrocarbon degradation activity of endophytic, bacteria isolated from *Chelidonium majus* L., Microb. Cell Fact. 17, 171 (2018) oraz Olga Marchut-Mikołajczyk, Piotr Drożdżyński, Arkadiusz Polewczyk, Wojciech Smulek, Tadeusz Antczak, Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion, Microb. Cell Fact. 20, 40 (2021)] znany jest sposób otrzymywania glikolipidowych biosurfaktantów z endofitycznego szczepu bakterii *Bacillus pumilus* 2A, charakteryzującego się właściwościami promowania wzrostu roślin, zarówno na terenie zanieczyszczonym związkami ropopochodnymi (poddanymi silnej antropopresji) oraz w warunkach *in vitro*.

Dotychczas nie są znane sposoby otrzymywania biologicznego preparatu chitozanu i glikolipidów.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu otrzymywania biologicznego preparatu do stymulacji wzrostu i ochrony roślin z wykorzystaniem chitozanu i glikolipidów.

Sposób otrzymywania biologicznego preparatu do stymulacji wzrostu i ochrony roślin z wykorzystaniem szczepu *Bacillus pumilus* 2A, którego otrzymanie polega na uaktywnieniu szczepu bakterii na skosach agarowych o składzie w procentach wagowych: 1% peptonu; 0,5% ekstraktu drożdżowego; 0,5% chlorku sodu; 2,5% agaru, hodowli na tym podłożu inokulum w temperaturze 30°C, w czasie 14–20 godzin, zmyciu wyhodowanej biomasy za pomocą soli fizjologicznej, finalnie uzyskując OD₆₀₀ 1,5–2,2, zaszczepieniu otrzymanym inokulum w ilości 0,5–2% płynnego podłoża hodowlanego zawierającego w składzie w procentach wagowych: siarczan magnezu siedmiokrotnie uwodniony 0,02%, chlorek wapnia bezwodny 0,02%, diwodorofosforan potasu 1%, wodorofosforan dipotasu 1%, azotan amonu 1%, chlorek żelaza 0,005%, młoto browarnicze 3–8%, wysterylizowanego w temperaturze 121°C, w czasie 15 minut, i przeprowadzeniu hodowli w fermentorze laboratoryjnym o pojemności 30 L w czasie 96–168 godzin, przy stopniu wypełnienia fermentora 60–70% objętościowych, utrzymując temperaturę 30°C i mieszanie o szybkości obrotów mieszadła 160–200 min⁻¹, a następnie separacji biomasy i cząstek stałych pozostałych po produkcji, stosując do tego celu wirowanie z prędkością obrotową 12000–18000 min⁻¹, a następnie ekstrakcji z płynu pohodowlanego biosurfaktanta zakwaszając płyn z wykorzystaniem 6M HCl do pH 2,0 i pozostawiając go na 24 godziny w lodówce, separacji powstałego precypitatu poprzez wirowanie z prędkością obrotową 12000–18000 min⁻¹ i oczyszczeniu z wykorzystaniem mieszaniny chloroform : metanol w stosunku objętościowym 2:1, rozpuszczeniem osadu

w 0,1 M roztworze wodorowęglanu, sodu, a następnie liofilizacji **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że do nie więcej niż 2,0% wagowego roztworu chitozanu o stopniu deacetylacji 65–95% i masie cząsteczkowej nie większej niż 360 kDa, w 0,4–0,45% wagowym roztworze wodnym kwasu mlekowego, o pH nie większym niż 5,0, ewentualnie skorygowanym przy użyciu 3% wagowego roztworu wodnego wodorotlenku potasu do wartości nie większej niż 6,6, dodaje się, mieszając za pomocą homogenizatora o poziomie rozdrobnienia 10–100 mm (G45 G), o szybkości obrotów 4000–5200 min⁻¹, w czasie 20–40 min, glikolipidy w formie liofilizatu otrzymane ze szczepu *Bacillus pumilus* 2A, w ilości nie większej niż 25% wagowych w stosunku do zawartości chitozanu w preparacie lub wodny roztwór liofilizatu glikolipidów z *Bacillus pumilus* 2A, o stężeniu nie większym niż 1,0% wagowy, przy stosunku objętościowym 1:1.

Sposób według wynalazku umożliwia otrzymanie biologicznego preparatu stymulującego wzrost roślin i hamującego rozwój fitopatogenów pochodzenia grzybowego oraz wspierającego naturalne mechanizmy obronne roślin.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady:

Przykład I

Chitozan w ilości 1 grama rozpuszczono w 100 ml 0,45% wagowego roztworu wodnego kwasu mlekowego, o pH 4,60, kolejno dodawano mieszając na mieszadle magnetycznym o prędkości obrotowej 2000 min⁻¹, rozdrobniony wcześniej w moździerzu liofilizat glikolipidów z *Bacillus pumilus* 2A, który otrzymano: uaktywniając szczep bakterii na skosach agarowych o składzie w procentach wagowych: 1% peptonu; 0,5% ekstraktu drożdżowego; 0,5% chlorku sodu; 2,5% agaru, hodowli na tym podłożu inokulum w temperaturze 30°C, w czasie 14 godzin, myciu wyhodowanej biomasy za pomocą soli fizjologicznej, finalnie uzyskując OD600 1,8, zaszczepieniu otrzymanym inokulum w ilości 0,5% płynnego podłoża hodowlanego zawierającego w składzie w procentach wagowych: siarczan magnezu siedmiokrotnie uwodniony 0,02%; chlorek wapnia bezwodny 0,02%, diwodorofosforan potasu 1%, wodorofosforan dipotasu 1%, azotan amonu 1%, chlorek żelaza 0,005%, młóto browarnicze 5%, wysterylizowanego w temperaturze 121°C, w czasie 15 minut, i przeprowadzeniu hodowli w fermentorze laboratoryjnym o pojemności 30 L w czasie 96 godzin, przy stopniu wypełnienia fermentora 70% objętościowych, utrzymując temperaturę 30°C i mieszanie o szybkości obrotów mieszadła 160 min⁻¹, a następnie separacji biomasy i cząstek stałych pozostałych po produkcji, stosując do tego celu wirowanie z prędkością obrotową 12000 min⁻¹, a następnie ekstrakcji z płynu pohodowlanego biosurfaktanta zakwaszając płyn z wykorzystaniem 6 M HCl do pH 2,0 i pozostawiając go na 24 godziny w lodówce, separacji powstałego precypitatu poprzez wirowanie z prędkością obrotową 12000 min⁻¹ i oczyszczeniu z wykorzystaniem mieszaniny chloroform : metanol w stosunku objętościowym 2:1, rozpuszczeniem osadu w 0,1 M roztworze wodorowęglanu sodu, a następnie liofilizacji. Liofilizat glikolipidów z *Bacillus pumilus* 2A dodano w ilości 25% wagowych w stosunku do zawartości chitozanu w preparacie. Stosowano chitozan o średnim ciężarze cząsteczkowym 160 kDa i stopniu deacetylacji na poziomie 80,0%. Do przygotowania biologicznego preparatu wykorzystano homogenizator z końcówką pozwalającą na rozdrobnienie w zakresie 10–100 mm (G45 G) o prędkości obrotowej 4000 min⁻¹, przez 20 minut.

Otrzymany biologiczny preparat zastosowano w celu promocji wzrostu roślin wskaźnikowych pochodzących z zestawu Phytotoxkit®.

Efektywność procesu stymulacji wzrostu roślin otrzymanego biologicznego preparatu określono na podstawie oceny wzrostu roślin wskaźnikowych w glebie (*Sinapis alba* – gorczyca biała; *Sorghum* – sorgo; *Lepidium sativum* – rzeżucha), w której osiągnięto maksimum pojemności wodnej gleby stosując roztwór preparatu, a jako próbę kontrolną stosując wodę. Dodatek biokompozytu pozwolił na zwiększenie plonu biomasy roślin wskaźnikowych o odpowiednio 43%, 39% i 42%.

Otrzymany preparat zastosowano w celu zahamowania wzrostu grzybowych fitopatogenów z rodzaju *Fusarium* oraz *Candida*.

Efektywność hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych przez otrzymany preparat określono na podstawie metody krążkowo-dyfuzyjnej.

Stałe podłoża wzrostowe o składzie w częściach wagowych: azotan sodu 0,3; wodorofosforan dipotasu 0,1; siarczan magnezu siedmiowodny 0,05; chlorek potasu 0,05; chlorek żelaza 0,001; sacharoza 3,0; agar 1,5; rozlano na płytki Petriego a następnie zaszczepiono zawiesiną zarodników *Fusarium oxysporum* o stężeniu 10⁶ jtk/ml, w ilości 0,2 ml na płytkę lub zawiesiną biomasy drożdży *Candida albicans* o gęstości optycznej 0,9, w ilości 0,2 ml na płytkę. Następnie na płytkach umiesz-

czono krążki bibułowe nasączone roztworem preparatu przygotowanego jak powyżej. Płytki inkubowano przez 120 godzin w temperaturze 30°C. Średnice strefy inhibicji wzrostu wokół krążka nasyczonego roztworem biokompozytu wynosiły 16–27 mm w przypadku *Fusarium oxysporum* i 15–29 mm w przypadku *Candida albicans*.

Przykład II

Chitozan w ilości 2 g rozpuszczono w 100 ml 0,45% wagowego roztworu wodnego kwasu mlekowego, o pH 6,30, kolejno dodawano mieszając na mieszadle magnetycznym o prędkości obrotowej 2000 min⁻¹, rozdrobniony wcześniej w moździerzu liofilizat glikolipidów z *Bacillus pumilus* 2A, który otrzymano jak w przykładzie 1, w ilości 10% wagowych w stosunku do zawartości chitozanu w preparacie. Stosowano chitozan o średnim ciężarze cząsteczkowym 160 kDa i stopniu deacetylacji na poziomie 80%. Wartość pH roztworu mlecza chitozanu regulowana była za pomocą roztworu wodorotlenku potasu o stężeniu 3,0%. Do przygotowania kompozycji wykorzystano homogenizator z końcówką pozwalającą na rozdrobnienie w zakresie 10–100 µm (G45 G) o prędkości obrotowej 4200 min⁻¹, przez 40 minut.

Otrzymany preparat zastosowano w celu promocji wzrostu roślin wskaźnikowych pochodzących z zestawu Phytotoxkit®.

Efektywność procesu stymulacji wzrostu roślin otrzymanego preparatu określono na podstawie oceny wzrostu roślin wskaźnikowych w glebie (*Sinapis alba* – gorczyca biała; *Sorghum* – sorgo; *Lepidium sativum* – rzeżucha), w której osiągnięto maksimum pojemności wodnej gleby stosując roztwór preparatu, a jako próbę kontrolną stosując wodę. Dodatek biokompozytu pozwolił na zwiększenie plonu biomasy roślin wskaźnikowych o odpowiednio 37%, 39% i 41%.

Otrzymany preparat zastosowano w celu zahamowania wzrostu grzybowych fitopatogenów z rodzaju *Fusarium* oraz *Candida*.

Efektywność hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych przez otrzymany preparat określono na podstawie metody krążkowo-dyfuzyjnej.

Stałe podłoża wzrostowe o składzie w częściach wagowych: azotan sodu 0,3; wodorofosforan dipotasu 0,1; siarczan magnezy siedmiowodny 0,05; chlorek potasu 0,05; chlorek żelaza 0,001; sacharoza 3,0; agar 1,5; rozlano na płytki Petriego, a następnie zaszczerpiono zawiesiną zarodników *Fusarium oxysporum* o stężeniu 10⁷ jtk/ml, w ilości 0,15 ml na płytkę lub zawiesiną biomasy drożdży *Candida albicans* o gęstości optycznej 0,8, w ilości 0,15 ml na płytkę. Następnie na płytkach umieszczono krążki bibułowe nasączone roztworem preparatu przygotowanego jak powyżej. Płytki inkubowano przez 120 godzin w temperaturze 30°C. Średnice strefy inhibicji wzrostu wokół krążka nasyczonego roztworem biokompozytu wynosiły 16–30 mm w przypadku *Fusarium oxysporum* i 13–22 mm w przypadku *Candida albicans*.

Przykład III

Chitozan w ilości 1,5 g rozpuszczono w 100 ml 0,40% wagowego roztworu wodnego kwasu mlekowego, o pH 6,50, dodawano wodny roztwór glikolipidów z *Bacillus pumilus* 2A, który otrzymano jak w przykładzie 1, o stężeniu 20% wagowych. Roztwór glikolipidów połączono z roztworem soli chitozanu w stosunku objętościowym 1:1. Stosowano chitozan o średnim ciężarze cząsteczkowym 360,0 kDa i stopniu deacetylacji na poziomie 95,0%. Wartość pH roztworu mlecza chitozanu regulowana była za pomocą roztworu wodorotlenku potasu o stężeniu 3,0% wagowych. Do przygotowania kompozycji wykorzystano homogenizator z końcówką pozwalającą na rozdrobnienie w zakresie 10–100 µm (G45 G) o prędkości obrotowej 4000 min⁻¹, przez 20 minut.

Przykład IV

Chitozan w ilości 2 g rozpuszczono w 100 ml 0,40% wagowego roztworu kwasu mlekowego, o pH 4,80, kolejno dodawano wodny roztwór glikolipidów z *Bacillus pumilus* 2A, który otrzymano jak w przykładzie 1, o stężeniu 25% wagowych. Roztwór glikolipidów połączono z roztworem soli chitozanu w stosunku objętościowym 1:1. Stosowano chitozan o średnim ciężarze cząsteczkowym 360,0 kDa i stopniu deacetylacji na poziomie 65,0%. Wartość pH roztworu mlecza chitozanu regulowana była za pomocą roztworu wodorotlenku potasu o stężeniu 3,0% wagowych. Do przygotowania kompozycji wykorzystano homogenizator z końcówką pozwalającą na rozdrobnienie w zakresie 10–100 µm (G45 G) o prędkości obrotowej 5200 min⁻¹, przez 40 minut.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób otrzymywania biologicznego preparatu do stymulacji wzrostu i ochrony roślin z wykorzystaniem szczepu *Bacillus pumilus* 2A, którego otrzymanie polega na uaktywnieniu szczepu bakterii na skosach agarowych o składzie w procentach wagowych: 1% peptonu; 0,5% ekstraktu drożdżowego; 0,5% chlorku sodu; 2,5% agaru, hodowli na tym podłożu inokulum w temperaturze 30°C, w czasie 14–20 godzin, zmyciu wyhodowanej biomasy za pomocą soli fizjologicznej, finalnie uzyskując OD₆₀₀ 1,5–2,2, zaszczepieniu otrzymanym inokulum w ilości 0,5–2% płynnego podłoża hodowlanego zawierającego w składzie w procentach wagowych: siarczan magnezu siedmiokrotnie uwodniony 0,02%, chlorek wapnia bezwodny 0,02%, diwodorofosforan potasu 1%, wodorofosforan dipotasu 1%, azotan amonu 1%, chlorek żelaza 0,005%, młóto browarnicze 3–8%, wysterylizowanego w temperaturze 121°C, w czasie 15 minut, i przeprowadzeniu hodowli w fermentorze laboratoryjnym o pojemności 30 L w czasie 96–168 godzin, przy stopniu wypełnienia fermentora 60–70% objętościowych, utrzymując temperaturę 30°C i mieszanie o szybkości obrotów mieszadła 160–200 minuta⁻¹, a następnie separacji biomasy i cząstek stałych pozostałych po produkcji, stosując do tego celu wirowanie z prędkością obrotową 12000–18000 minuta⁻¹, a następnie ekstrakcji z płynu pohodowlanego biosurfaktanta zakwaszając płyn z wykorzystaniem 6 M HCl do pH 2,0 i pozostawiając go na 24 godziny w lodówce, separacji powstałego precypitatu poprzez wirowanie z prędkością obrotową 12000–18000 minuta⁻¹ i oczyszczeniu z wykorzystaniem mieszaniny chloroform : metanol w stosunku objętościowym 2:1, rozpuszczeniem osadu w 0,1 M roztworze wodorowęglanu sodu, a następnie liofilizacji, **znamienny tym**, że do nie więcej niż 2,0% wagowego roztworu chitozanu o stopniu deacetylacji 65–95% i masie cząsteczkowej nie większej niż 360 kDa, w 0,4–0,45% wagowym roztworze wodnym kwasu mlekowego, o pH nie większym niż 5,0, ewentualnie skorygowanym przy użyciu 3% wagowego roztworu wodnego wodorotlenku potasu do wartości nie większej niż 6,6, dodaje się, mieszając za pomocą homogenizatora o poziomie rozdrobnienia 10–100 mm (G45 G), o szybkości obrotów 4000–5200 min⁻¹, w czasie 20–40 min, glikolipidy w formie liofilizatu otrzymane ze szczepu *Bacillus pumilus* 2A, w ilości nie większej niż 25% wagowych w stosunku do zawartości chitozanu w preparacie lub wodny roztwór liofilizatu glikolipidów z *Bacillus pumilus* 2A, o stężeniu nie większym niż 1,0% wagowy, przy stosunku objętościowym 1:1.