

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239291**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427546**

(22) Data zgłoszenia: **26.10.2018**

(51) Int.Cl.
A01G 7/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C02F 1/78 (2006.01)

(54) **Sposób przygotowania mediów do hodowli makrofitów wodnych z rodziny Lemnaceae**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
04.05.2020 BUP 10/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.11.2021 WUP 34/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Łódzki, Łódź, PL
POLITECHNIKA Łódzka, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ZDZISŁAWA ROMANOWSKA-DUDA, Łódź, PL
KRZYSZTOF ŚMIGIELSKI, Łódź, PL
KRZYSZTOF PIOTROWSKI, Łódź, PL
PIOTR DZIUGAN, Zgierz, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Wojciech Zajączkowski

PL 239291 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób przygotowania mediów do hodowli makrofity wodnych z rodziny Lemnaceae,

Makrofity wodne z rodziny *Lemnaceae* z uwagi na wysoką zawartość białka stanowią potencjalne źródło pożywienia dla ludzi i zwierząt. Rośliny te znalazły również wiele zastosowań, przede wszystkim jako maty filtrujące z uwagi na swoje zdolności fitoremediacyjne. Rośliny te stosowane są na całym świecie, w tym również w Polsce, do biologicznego oczyszczania wód i ścieków, a także ostatnio jako najnowsze źródło biomasy energetycznej do produkcji bioetanolu.

Lemnaceae wzrastając w warunkach właściwego im oświetlenia nie wymagają specjalnych suplementacji podłoża substancjami stymulującymi wzrost roślin, jednak w przypadku ich zastosowania, pożywka uzupełnienia jest preparatami humusowymi lub ekstraktem torfowym. Ze względu na złożoność procesów i otrzymanie niejednorodnych danych, brak jest jednoznacznych rezultatów i wymagają one dalszych badań, gdyż otrzymywano różne wyniki zależnie od stosowanych warunków hodowli. Przykładowo w doświadczeniach wykonanych przez Hutnera *et al.* (1950, cyt. wg Landolt, 1957. E. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 67) wykazano, że ekstrakt z torfu i ekstrakt nawozowy nie wywierały stymulującego działania na wzrost i rozwój roślin przynależnych do *Lemnaceae* (*Spirodela oligorrhiza*). Z kolei w pracy Wcisło (1963) (Wcisło H., 1963. Some observations on lines of *Lemna trisulca* L. grown under aseptic conditions. – Acta biol.

Cracoviensia Ser. Botanica 6: 161–179) podczas hodowli roślin wodnych *Lemna trisulca* na suplementownym medium Pfeffera przygotowanym na ekstrakcie torfowym w stężeniu 1%, uzyskano istotnie, wyższą biomasę roślin. Jednak hodowane na wspomnianym podłożu te same rośliny, bez suplementacji składnikami mineralnymi i bez obecności cukrów długo zachowywały żywotność, lecz z kolei bardzo słabo rosły, a suplementacja medium Pfeffera 0,04% peptonem: bakteriologicznym spowodowała deformację członów pędowych roślin *Lemna trisulca*, wyrażające się ich zwijaniem (Wcisło, H.: Some observations on clones of *Lemna trisulca* L. grown under aseptic conditions. – Acta Biol. Cracoviensia Ser. Botanica 6: 161–179). Jednym ze sposobów stosowanych dla stymulacji wzrostu makrofity *Lemnaceae* jest zastosowanie metody przewietrzania pożywki.

Liczne badania dowiodły stymulowanego wzrostu roślin z rodziny *Lemnaceae* na różnych podłożach mineralnych suplementowanych znaczną ilością wapnia. Zjawisko to jest znane, ponieważ *Lemnaceae*, jako rośliny wyższe, posiadają znaczne wymagania w zakresie makroelementów. Nie jest to fakt nieoczekiwany jeśli zważyć, że *Lemnaceae* należą do roślin wyższych – kwiatowych i wymagają wapnia do swego rozwoju, a także wielu mikroelementów w tym cynku, boru, manganu i molibdenianu. Z tego powodu najczęściej do hodowli stosuje się medium Hutnera (Landolt E., 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 67), Pirsona i Seidela (Kandeler R., 1955, Über die Blütenbildung bei *Lemna gibba* L. I. Kulturbedingungen und Tageslängen abhängigkeit, Zeit f. Bot. 43, 61–71.) oraz Hoaglanda (Bonner i Galston 1952, Principles of Plant Physiology, Vol. 115, Issue 2995, pp. 580). Medium wg Hutnera (Landolt E 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 67) składa się z wysokiej zawartości mikroelementów, a także Na₂EDTA i (sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminocztero-octowego). Ponadto w przypadku medium mineralnego, które jest bardziej alkaliczne (pH powyżej 6), przyswajalność żelaza w formie organicznej (cytrynian lub winian żelazowy) znacznie wzrasta, a dodatkowo suplementacja poprzez EDTA wpływa na zwiększone przyswajanie jonów żelaza w formie soli nieorganicznej. Wieloma badaniami został potwierdzony rezultat, iż najlepszy wzrost, osiągają, rośliny wodne z rodziny *Lemnaceae* w zakresie pH medium 4,8–6,1, a niewielkie odchylenia od wskazanej wartości nie mają większego znaczenia (Henssen 1954, Landolt E., 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an *Lemnaceen*. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 67). W celu polepszenia wzrostu wegetatywnego kultur pożywka suplementowana jest organicznym źródłem węgla, w postaci 1% sacharozy lub fruktozy czy glukozy (Gorham P. R 1945, Growth factor studies with *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schleid. Am. J. Bot. 32, 496–505.; Henssen 1954, Die Dauerorgane von *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schleid, in physiologischer Betrachtung. Flora, 141, 523–566; Kandeler R., 1955, Über die Blütenbildung bei *Lemna gibba* L. I. Kulturbedingungen und Tageslängen abhängigkeit, Zeit f. Bot. 43, 61–71; Czopek 1959, Researches on the physiology of formation and germination of turions in *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schleiden, Acta. Biol. Crac. Ser. Bot. 2, 76–90; Wcisło H., 1963. Some observations on lines of *Lemna trisulca* L. grown under aseptic conditions. – Acta Biol. Crac. Ser. Botanica 6: 161–179).

Ponadto Landolt wykazał (Landolt E., 1957, Physiologische und ökologische Untersuchungen an *Lemnaceen*. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 67), że rozcieńczenie 10- krotnie medium wg Hutnera, tylko w niewielkim stopniu powoduje inhibicję wzrostu roślin. Jednak odwrotną reakcję zaobserwowano dla medium wg Pirsona i Seideia (Kandeler R., 1955, Über die Blütenbildung bei *Lemna gibba* L. I. Kulturbedingungen und Tageslängen abhängigkeit, Zeit f. Bot. 43, 61–71) gdzie wystąpiło silne zahamowanie wzrostu *Lemna gibba* (Czopek 1959, Cultivation of Polish *Lemnaceae* species in laboratory conditions. Acta. Biol. Crac. Ser. Bot. 2, 76–90). Ponadto pięciokrotne stężenie pożywki wg Hutnera powoduje zupełne zahamowanie wzrostu obydwu gatunków roślin *Lemna* i *Wolffia*. Z kolei badania Wcisło (1963) prowadzone w warunkach aseptycznych nad morfologiczno-fizjologicznymi różnicami w obrębie klonów *Lemna trisulca* potwierdziły możliwość hodowli roślin na pożywce Hoaglanda i Clarka (The, water-culture method for growing plants without soil. Circular, California Agricultural Experiment Station, 347, 1938; Wcisło H., 1963. Some observations on lines of *Lemna trisulca* L. grown under aseptic conditions. Acta Biol. Crac. Ser. Botanica 6: 161–179) oraz na zmodyfikowanej pożywce Rhodego i Pfeffera (Wcisło H., 1963. Some observations on lines of *Lemna trisulca* L. grown under aseptic conditions. Acta biol. Cracoviensia Ser. Botanica 6: 161-179). Z kolei na medium Hutnera (Landolt E., 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 67), Knopa (Reski, R., and Abel, W. O. 1985 Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. Planta 165, 354-358), Pirsona i Seidela (Kandeler R., 1955, Über die Blütenbildung bei *Lemna gibba* L. I. Kulturbedingungen und Tageslängen abhängigkeit, Zeit f. Bot, 43,. 61–71) *Lemna trisulca* wzrastała znacznie wolniej.

Sposób, przygotowań i a mediów do hodowli makrofitów wodnych z rodziny *Lemnaceae*, według wynalazku polega na tym, że podłoże w postaci roztworu wodnego odcieków po fermentacji beztlenowej towarzyszącej produkcji biogazu o stężeniu suchej substancji 0,1–10% poddaje się ozonowaniu stosując 0,01–10 części wagowych ozonu na 100 części wagowych podłoża, w temperaturze 0–50°C.

W innym wariantcie według wynalazku ozonowanie prowadzi się przepuszczając przez podłoże mieszaninę tlenu i ozonu.

Proces prowadzi się w sposób ciągły lub okresowy.

Sposób przygotowania mediów do hodowli makrofitów wodnych z rodziny *Lemnaceae* według wynalazku pozwala na uzyskanie podłoża, którego stosowanie zwiększa przyrost biomasy-makrofitów wodnych z rodziny *Lemnaceae* od 50 do 100% w stosunku do tego samego podłoża nie poddanego procesowi ozonowania. Sposób ten nie powoduje generowania inhibitorów-wzrostu makrofitów wodnych z rodziny *Lemnaceae*. W porównaniu ze znanymi sposobami suplementacji-mediów hodowlanych jest znacznie prostszy. Stosując sposób według wynalazku przyspiesza się wzrost biomasy makrofitów i poprawia jakość finalnej biomasy.

Sposób według wynalazku ilustruje poniższy przykład.

P r z y k ł a d

Ozonowaniu poddano wodny odciek po fermentacji beztlenowej towarzyszącej produkcji biogazu z wywarów gorzelnicznych o stężeniu suchej substancji 0,1–5%. W tym celu 100 kg odcieku umieszczono w reaktorze, po czym przepuszczano przez ten roztwór mieszaninę tlenu i ozonu zawierającą 80 g ozonu w 1 m³, w temperaturze 20°C. Proces ozonowania zakończono po przepuszczeniu przez odciek 0,25 kg ozonu.

Po zakończeniu ozonowania odciek zaszczerpiono 1 kg biomasy makrofitów wodnych z rodziny *Lemnaceae*. Wzrost roślin prowadzono w reaktorze otwartym w ciągu 10 dni. W wyniku przeprowadzonej hodowli odnotowano zwiększony przyrost biomasy roślin o 100% (8 kg) w stosunku do próby kontrolnej (4 kg), którą była analogiczna hodowla na podłożu nie poddanym ozonowaniu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób przygotowania podłóż do hodowli makrofitów wodnych z rodziny *Lemnaceae*, **znamienny tym**, że podłoże w postaci roztworu wodnego odcieków po fermentacji *beztlenowej* towarzyszącej produkcji biogazu o stężeniu suchej substancji 0,1–10% poddaje się ozonowaniu stosując 0,01–10 części wagowych ozonu na 100 części-wagowych podłoża, w temperaturze 0–50°C.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ozonowanie prowadzi się przepuszczając przez roztwór wodny podłoża mieszaninę tlenu i ozonu.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że ozonowanie prowadzi się w sposób ciągły.
4. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że ozonowanie prowadzi się w sposób okresowy.