RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241569**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **438224**

(22) Data zgłoszenia: **22.06.2021**

(51) Int.Cl.
C05C 1/00 (2006.01)
C05G 5/12 (2020.01)
C05F 11/08 (2006.01)
C05F 17/20 (2020.01)

(54) **Bionawóz i sposób jego otrzymywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
09.05.2022 BUP 19/22

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.10.2022 WUP 44/22

(73) Uprawniony z patentu:
BACTO - TECH SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Toruń, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
MACIEJ WALCZAK, Cierpice, PL
ALEKSANDRA BURKOWSKA-BUT, Toruń, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Grzegorz Ćwikliński

PL 241569 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest bionawóz w formie granulowanego nawozu mineralnego z użyciem bakterii heterotroficznych z rodzaju *Bacillus* i sposób jego otrzymywania.

Bakterie z rodzaju *Bacillus* występują powszechnie w glebie, wodach słodkich i słonych, na roślinach zarówno żywych, jak i obumarłych. Stwierdzono, że szczepy *Bacillus subtilis* i *Bacillus megaterium* chronią rośliny zapobiegając lub hamując rozwój chorób grzybiczych. Intensywne ich namnażanie w glebie następuje po wprowadzeniu do gleby materii organicznej np. obornika, jednak po jej rozłożeniu bakterie te przechodzą w formę przetrwalnikową lub giną.

Azot i fosfor są jednymi z głównych makroskładników pobieranych z gleby, które stanowią budulec komórek roślinnych. Większość roślin uprawnych, poza bobowatymi zwanymi popularnie motylkowymi, nie jest zdolna do przyswajania azotu atmosferycznego, w związku z tym pierwiastki te muszą być dostarczone w formie nawozów mineralnych przeważnie azotanów i fosforanów w celu zwiększenia plonowania roślin. Nawozy te łatwo wypłukiwane z gleby, oddziaływają negatywnie na środowisko naturalne poprzez zanieczyszczenie wód azotanami i fosforanami czy poprzez emisję gazów cieplarnianych, takich jak tlenek(I) azotu. Wieloletnie stosowanie nawozów mineralnych wpływa niekorzystnie na glebę, wyjawiając i degradując ją, oddziaływa negatywnie na równowagę środowiska naturalnego.

Z polskiego opisu zgłoszenia wynalazku P.431350 znany jest bionawóz w postaci granul nawozu mineralnego z otoczką zawierającą preparaty biologicznie aktywne oraz lepiszcze neutralne względem nawozu i preparatów biologicznie aktywnych. Wynalazek charakteryzuje się tym, że otoczka zawiera lepiszcze w postaci polimeru z grupy polieterów o temperaturze topnienia w zakresie 40–90°C z ewentualnym dodatkiem gliceryny, a także ewentualnie jedną lub więcej substancji pomocniczych z grupy sacharydów lub cukroli w ilości 0–50% masy otoczki, a otoczka stanowi 2–20% masy bionawozu. Korzystnie polimerem jest poli(tlenek etylenu) zastosowany samodzielnie lub z dodatkiem gliceryny w stosunku wagowym gliceryny do polimeru od 1:10 do 1:3.

Celem wynalazku jest uzyskanie bionawozu z użyciem komórek bakterii heterotroficznych z rodzaju *Bacillus* i nawozu azotowego zapewniającego utrzymanie żywych bakterii na granulach nawozu przez co najmniej 12 miesięcy przy akceptowalnym spadku liczebności komórek na granulach nie większym jak o jeden rząd wielkości w porównaniu do wartości pierwotnej.

Istotą wynalazku jest granulowany nawóz azotowy charakteryzujący się tym, że na 100 części wagowych nawozu azotowego o zawartości do 26% azotu (N) w tym w formie amonowej do 19% i do 7% w formie saletrzanej zawiera 1 część mieszaniny oleju rzepakowego i liofilizowanych komórek bakterii *Bacillus subtilis* o zawartości $3x10^{11}$ komórek bakterii na 1 gram liofilizatu, przy czym proporcja liofilizat:olej rzepakowy wynosi 1:100.

Istotą wynalazku jest również sposób otrzymywania granulowanego nawozu azotowego charakteryzujący się tym, że na 100 części granulowanego nawozu mineralnego o zawartości do 26% azotu (N), w tym w formie amonowej 19% i 7% w formie saletrzanej natryskuje się 1 część mieszaniny liofilizowanych komórek bakterii *Bacillus subtilis* o zawartości $3 x10^{11}$ komórek bakterii z olejem rzepakowym w proporcji liofilizat:olej rzepakowy 1:100, przy czym mieszanie liofilizatu z olejem rzepakowym przed natryskiem przeprowadza się za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego, a mieszanie granul po natrysku dokonuje się w mieszadle planetarnym przez czas nie krótszy niż 10 minut.

Otrzymany sposobem według wynalazku bionawóz zawiera od 10^3 do $9,5 \cdot 10^6$ jednostek tworzących kolonię (j.t.k.).

Sposób wg wynalazku cechuje się prostotą procesu produkcyjnego, nie wymaga stosowania kosztownej aparatury oraz szkodliwych substancji pomocniczych, a także w procesie produkcji nie powstają odpady.

Wynalazek przedstawiono w przykładzie wykonania.

Do 200 g granulowanego nawozu mineralnego Saletrosan® 26 stanowiącego mieszaninę azotanu amonu i siarczanu amonu z dodatkiem mączki dolomitowej, bogatej w wapń i magnez o zawartości 26% azotu (N), w tym w formie amonowej 19% i 7% w formie saletrzanej oraz 13% siarki (S) w formie siarczanu dodano przez natrysk 2,0 g mieszaniny liofilizowanych komórek bakterii *Bacillus subtilis* o zawartości $3 x10^{11}$ komórek bakterii na 1 gram liofilizatu z olejem rzepakowym w proporcji liofilizat:olej rzepakowy 1:100. Mieszanie liofilizatu z olejem rzepakowym przeprowadzono za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego, a wymieszanie z nawozem mineralnym dokonano w mieszadle planetarnym przez 10 minut.

Następnie w celu określenia wpływu czasu składowania zmodyfikowanych granul nawozu na przeżywalność bakterii umieszczono 7 porcji po 10 g granul nawozu pokrytych mieszanką liofilizatu z olejem rzepakowym w oddzielnych otwartych pojemnikach i oznaczano liczebność żywych i zdolnych do wzrostu bakterii w następujących odstępach czasowych po naniesieniu bakterii: (T0 – niezwłocznie po wymieszaniu, T1 – 1 tydzień, T2 – 2 tygodnie, T3 – miesiąc, T4 – 2 miesiące, T5 – 6 miesięcy, T6 – 12 miesięcy).

Dla porównania z innymi, znanymi ze stanu techniki nośnikami bakterii dodawanymi do nawozów mineralnych wykonano wyżej wymienione działania, zastępując w jednym przypadku olej rzepakowy gliceryną a w drugim mieszaniną gliceryny z wodą w stosunku 1:1 z dodatkiem 5% wyciągu drożdżowego.

Oznaczanie liczebności żywych i zdolnych do wzrostu komórek bakterii *Bacillus subtilis* na granulach nawozu.

Każde 10 g nawozu wraz z naniesionymi bakteriami po określonym czasie T składowania rozpuszczano w 90 ml zbuforowanej wody peptonowej, w ten sposób uzyskano rozcieńczenie 10^{-1}. Z tak przygotowanego rozcieńczenia pobierano 1 ml i przenoszono do 9 ml zbuforowanej wody peptonowej, uzyskując rozcieńczenie 10^{-2}. Procedurę wykonywano analogicznie aż do uzyskania rozcieńczenia 10^{-7}. Następnie z rozcieńczeń od 10^{-7} do 10^{-5} wykonano wysiewy wgłębne (lane) na pożywkę PCA. Inkubację prowadzono przez 4 doby w temperaturze 26°C. Po tym czasie zliczano wyrosłe kolonie, a ich liczbę przeliczano z uwzględnieniem rozcieńczenia, na liczebność żywych i zdolnych do wzrostu komórek w 1 g nawozu.

Poniższa tabela obrazuje przeżywalność komórek bakterii *Bacillus subtilis*, na granulach nawozu azotowego w zależności od czasu i nośnika.

	Liczebność komórek na granulach nawozu w zależności od zastosowanego nośnika [jtk x 10^6/g]		
Czas analizy	gliceryna	Gliceryna +woda (1:1) + 5% wyciąg drożdżowego	Olej rzepakowy
T0	9,0	10,4	9,8
T1 (1 tydzień)	10,5	7,5	9,3
T2 (2 tygodnie)	8,7	3,5	8,4
T3 (miesiąc)	6,2	1,0	5,6
T4 (2 miesiące)	1,1	0,6	5,4
T5 (6 miesięcy)	0,8	0,3	2,7
T6 (12 miesięcy)	0,3	0,2	1,1

W przypadku nośników opartych na glicerynie zaobserwowano wiązanie wilgoci z powietrza, częściowe uwodnienie granul nawozu, co powodowało w konsekwencji wzrost ciśnienia osmotycznego w komórkach i wysoką śmiertelność komórek bakterii.

W przypadku zastosowania oleju rzepakowego jako nośnika liczebność żywych i zdolnych do wzrostu komórek utrzymywała się na zadowalającym poziomie tj. nie mniejszym niż 1 x 10^6 jtk/g granul.

Jednocześnie w celu określenia ewentualnego negatywnego wpływu danego nośnika na bakterie *Bacillus subtilis*, liofilizat zmieszano w proporcjach 1:100 z każdym z nośników: gliceryną, mieszaniną gliceryny z wodą (1:1) z dodatkiem 5% wyciągu drożdżowego oraz olejem rzepakowym bez łączenia z nawozem mineralnym. Mieszanie liofilizatu z nośnikami dokonano za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego.

Po wymieszaniu oznaczano liczebność komórek w mieszaninie analogicznie jak wyżej dla połączenia nośników z nawozem w czasie T0, a następnie w kolejnych okresach T1 – 1 tydzień, T2 – 2 tygodnie, T3 – miesiąc, T4 – 2 miesiące, T5 – 6 miesięcy, T6 – 12 miesięcy w celu oznaczenia przeżywalności komórek w nośniku.

	Liczebność komórek w badanym nośniku [jtk x 10^9/g]		
Czas analizy	gliceryna	Gliceryna +woda (1:1) + 5% wyciągu drożdżowego	Olej rzepakowy
T0	2,1	2,0	2,5
T1 (1 tydzień)	2,4	2,2	2,3
T2 (2 tygodnie)	1,9	2,8	1,9
T3 (miesiąc)	2,2	1,9	2,8
T4 (2 miesiące)	2,0	2,5	2,5
T5 (6 miesiący)	2,1	2,4	2,7
T6 (12 miesięcy)	1,9	2,1	2,4

We wszystkich tych mieszaninach liczebność żywych i zdolnych do wzrostu komórek bakterii *Bacillus* utrzymywała się na poziomie zasadniczo nie mniejszym niż 2,0 x 10^9 komórek/g. Zatem rodzaj samego nośnika bakterii nie ma znaczącego wpływu na żywotność komórek bakterii.

Zastrzeżenia patentowe

1. Bionawóz azotowy granulowany, **znamienny tym**, że na 100 części wagowych nawozu azotowego o zawartości do 26% azotu (N) w tym w formie amonowej do 19% i do 7% w formie saletrzanej zawiera 1 część mieszaniny oleju rzepakowego i liofilizowanych komórek bakterii *Bacillus subtilis* o zawartości 3 x 10^{11} komórek bakterii na 1 gram liofilizatu, przy czym proporcja liofilizat:olej rzepakowy wynosi 1:100.
2. Sposób otrzymywania granulowanego bionawozu azotowego, **znamienny tym**, że na 100 części granulowanego nawozu mineralnego o zawartości do 26% azotu (N), w tym w formie amonowej 19% i 7% w formie saletrzanej natryskuje się 1 część mieszaniny liofilizowanych komórek bakterii *Bacillus subtilis* o zawartości 3 x10^{11} komórek bakterii z olejem rzepakowym w proporcji liofilizat:olej rzepakowy 1:100, przy czym mieszanie liofilizatu z olejem rzepakowym przed natryskiem przeprowadza się za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego, a mieszanie granul po natrysku dokonuje się w mieszadle planetarnym przez czas nie krótszy niż 10 minut.