

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 242616 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437824**

(22) Data zgłoszenia: **2021.05.11**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.11.14 BUP 46/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.03.27 WUP 13/2023**

(51) MKP:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/07** (2006.01)

**C12R 1/38** (2006.01)

**C05F 11/08** (2006.01)

**B09C 1/10** (2006.01)

**A01N 63/22** (2020.01)

**A01N 63/27** (2020.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Warszawski, Warszawa, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ŁUKASZ DZIEWIT, Warszawa, PL**

**MICHAŁ STYCZYŃSKI, Warszawa, PL**

**KLAUDIA DĘBIEC-ANDRZEJEWSKA,**

**Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Anna Rożkowicz, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**Nowe szczepy bakterii psychrotolerancyjnych, kompozycja, ich zastosowanie oraz sposób bioaugmentacji gleby**

**PL 242616 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy zimnolubnych bakterii, kompozycja zawierająca takie szczepy, sposób bioaugmentacji gleby powyższymi szczepami i ich zastosowanie do promowania wzrostu roślin, przyrostu biomasy roślin, ochrony roślin przed patogenami oraz zwiększenia biodostępności żelaza w glebie.

### Dziedzina techniki

Strefa korzeniowa roślin jest jednym z najliczniej zasiedlonych przez mikroorganizmy obszarów gleby. Wiele bakterii obecnych w ryzosferze wykazuje korzystny wpływ na rośliny, przez co nazywane są bakteriami promującymi wzrost roślin (PGPB, ang. *Plant Growth Promoting Bacteria*). Poprawa kondycji roślin może wynikać pośrednio lub bezpośrednio z działania drobnoustrojów. Działania pośrednie obejmują przede wszystkim ograniczenie wzrostu patogenów (dzięki wytwarzanym grzybobójcom lub antybiotykami), natomiast bezpośrednie mechanizmy promocji wzrostu wiążą się m.in. z: (i) produkcją hormonów roślinnych, (ii) ułatwieniem przyswajania azotu, (iii) zwiększeniem biodostępności fosforu, (iv) zdolnością do rozkładania związków złożonych i ksenobiotyków oraz (v) produkcją szerokiej gamy metabolitów wtórnych, takich jak biosurfaktanty i związki chelatujące żelazo.

Żelazo jest czwartym najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem na Ziemi, będąc jednocześnie niezbędnym mikroelementem do wzrostu i metabolizmu organizmów żywych. W środowisku występuje ono zwykle jako Fe(III) w formie tlenków i wodorotlenków i jest bardzo słabo rozpuszczalne w pH powyżej 3. Żelazo jest składnikiem wielu istotnych enzymów roślinnych, takich jak cytochromy łańcucha transportu elektronów. Ponadto, bierze ono udział w biosyntezie chlorofilu oraz w utrzymaniu struktury i funkcji chloroplastów. Biorąc pod uwagę istotną rolę żelaza w funkcjonowaniu roślin, jego niska biodostępność sprawia, że jest ono jednym z głównych czynników limitujących ich wzrost naturze. W toku ewolucji, mikroorganizmy wykształciły skuteczne mechanizmy poboru żelaza ze środowiska. Jednym z nich jest zdolność do wytwarzania syderoforów. Są to niewielkie strukturalnie związki, o masie cząsteczkowej od 500 do 1500 daltonów, które wykazują silne powinowactwo do żelaza (III). Do tej pory zidentyfikowano kilkaset różnych syderoforów, klasyfikowanych na podstawie grup funkcyjnych do czterech podstawowych klas: i) hydroksamowych, ii) katecholowych, iii) karboksylowych i iv) mieszanych.

Niektóre rośliny posiadają zdolność do wytwarzania syderoforów, ale dotyczy to głównie jednoliściennych traw (*Poaceae*). Główne mechanizmy poboru żelaza przez rośliny obejmują przede wszystkim: i) aktywność reduktaz Fe(III); ii) uwalnianie pośrednich związków redukujących żelazo, np. fenoli; czy też iii) zakwaszanie ryzosfery. Co istotne, wiele gatunków roślin wykształciło receptory, które rozpoznają i umożliwiają wychwytywanie syderoforów wytwarzanych przez bakterie. W ten sposób wykorzystują one metabolity drobnoustrojów w celu uzupełnienia niedoboru żelaza. Ponadto wykazano, że syderofory pochodzenia bakteryjnego mają korzystny wpływ na indukcję systemicznej i nabytej odporności u roślin.

Wiele gatunków roślin uprawnych na świecie rozpoczyna cykl wegetacyjny wczesną wiosną lub nawet późną zimą. Okresy te charakteryzują się niskimi temperaturami oraz przymrozkami. W takich warunkach, powszechnie stosowane (jako bionawozy) bakterie mezofilne wykazują niską aktywność metaboliczną i zarazem nie promują wydajnie wzrostu roślin. Zastosowanie bakterii zimnolubnych (wyizolowanych np. z rejonów polarnych) stanowi skuteczną alternatywę dla bakterii mezofilnych, ponieważ ich właściwości psychrotolerancyjne, jak i szeroki zakres tolerancji temperatur, niwelują ograniczenia termiczne w promocji wzrostu roślin. Ponadto, ewolucyjne dostosowanie psychrotolerantów do ekstremalnych warunków środowiska wymusiło na nich wykształcenie odpowiednich cech adaptacyjnych, takich jak np. zdolność do produkcji pigmentów ochronnych, biosurfaktantów i syderoforów.

Ze stanu techniki znane jest zgłoszenie US2021054028 ujawniające sposób pobudzania wzrostu roślin i rozwoju korzeni, polepszania tolerancji na stres u rośliny, zwiększania plonów rośliny, dostarczania tlenu azotu do rośliny lub zwiększania produkcji chlorofilu w roślinie obejmujący podawanie peptydowego syderoforu, bakterii produkujących syderofor peptydowy lub kompozycji zawierającej syderofor peptydowy do rośliny.

Zgłoszenie CN111849815 ujawnia szczep rhizobacteria Gxun-20 pobudzający wzrost roślin. Szczep bakteryjny *Brevibacillus brevis* charakteryzuje się wydajnym wydzielaniem kwasu indolilo-3-ocetowego, rozpuszczaniem fosforu i zdolnościami pobudzania wzrostu roślin. Szczep to bakteria Gram dodatnia *Brevibacillus brevis* o morfologii okrągłej, gładkiej, wypukłej i białej kolonii bakteryjnej. Szczep

Gxun-20 może być stosowany do wspomagania wzrostu i rozwoju roślin, dzięki czemu skutecznie zmniejsza się zużycie nawozów chemicznych i tym samym niszczenie gleby.

Publikacja V. Nehra et al. 2016 „Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop” SpringerPlus 5(1):948 ujawnia szczep PGPR *Brevibacillus brevis* wpływający pozytywnie na wegetację bawełny poprzez stymulowanie wzrostu roślin. Szczep wyselekcjonowano ze 156 najbardziej obiecujących izolatów. Izolat bakterii został sprawdzony pod kątem wzrostu i przeżycia w wysokich temperaturach. Izolat był przeanalizowany również pod kątem cech PGP wykazywanych po obróbce cieplnej. Identyfikowano izolat pod względem morfologicznym, biochemicznym i przeprowadzono charakterystykę molekularną. Izolat został uznany za posiadający wiele atrybutów PGP, takich jak IAA, ARA, działanie przeciwwgrzybicze i produkcja amoniaku.

Badania w zakresie wykorzystania zimnolubnych szczepów do promocji wzrostu roślin są nieustannie prowadzone. W dzisiejszych czasach, przy ciągłej zmianie klimatu i coraz wyższej liczbie ludności, niezbędne są nowatorskie i skuteczne rozwiązania dla rolnictwa. Problemem technicznym jest dostarczenie zimnolubnych szczepów bakterii, które będą stanowić źródło nowych i unikalnych cech o potencjalnym zastosowaniu w wielu gałęziach przemysłu.

Przedmiotem wynalazku jest szczep *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00321.

Przedmiotem wynalazku jest szczep *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00322.

Przedmiotem wynalazku jest także szczep *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00320.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompozycja do bioaugmentacji gleby zawierająca szczep *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00321 i/lub *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00322, i/lub *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00320.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie powyżej określonych szczepów do promocji wzrostu roślin, przyrostu biomasy roślin, ochrony roślin przed patogenami oraz zwiększenia biodostępności żelaza w glebie.

Następnym przedmiotem wynalazku jest sposób bioaugmentacji gleby, w którym glebę inokuluje się szczepem psychrotolerancyjnym *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowanym w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00321 i/lub *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowanym w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00322, i/lub *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowanym w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00320.

Korzystnie, proces inokulacji obejmuje następujące etapy:

- a) namnożenie bakterii na podłożu hodowlanym
- b) oddzielenie biomasy bakteryjnej od podłoża
- c) oczyszczenie bakteryjnej biomasy z podłoża i resztek metabolitów bakterii
- d) ustalenie odpowiedniej proporcji objętości hodowli bakteryjnej do gleby
- e) dodanie biomasy bakteryjnej do gleby

Korzystnie, bakterie namnaża się w podłożu płynnym.

Korzystnie, biomasę oczyszcza się roztworem soli fizjologicznej NaCl 0,85%.

Korzystnie, wartość optyczna gęstości hodowli mierzona przy długości fali równej 600 nm wynosi 0,2 dla szczepu *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowanego pod nr B/00321 i *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowanego pod nr. B/00322 i 0,4 dla szczepu *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowanego pod nr. B/00320. Korzystnie, hodowle mikroorganizmów dodaje się do gleby w proporcji 0,4 L/kg suchej masy gleby.

Przedstawiony wynalazek dotyczy promocji wzrostu roślin za pomocą bioaugmentacji gleby psychrotolerancyjnymi (zimnolubnymi) szczepami bakterii – *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51.

Analizy genomiczne zastrzeganych szczepów bakterii, potwierdzone następnie licznymi badaniami funkcjonalnymi, ujawniły szerokie spektrum cech określanych jako promujące wzrost roślin. Jedną

z takich cech jest zdolność do wydajnej produkcji związków chelatujących żelazo – syderoforów. Szczepy według wynalazku wytwarzają trzy różne typy syderoforów – piowerdynę, wibrioferynę i bacilibaktynę. Analizy potwierdziły wpływ bakterii produkujących syderofory na zwiększenie biodostępności żelaza w badanej glebie, co bezpośrednio przekłada się na lepszą kondycję roślin. Co więcej, syderofory produkowane przez bakterie mogą bezpośrednio ograniczać rozwój patogenów, jak i wpływać korzystnie na systemy ochronne roślin. Zarówno *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59, jak i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 wykazują zdolności grzybobójcze, co również związane jest z wytwarzaniem przez nie syderoforów.

Szczepy bakterii według wynalazku produkują ponadto wiele użytecznych w środowisku enzymów (np. celulazy, ureazy i chitozanazy), co pozwala na dekompozycję licznych związków organicznych, w tym ksenobiotyków występujących w glebie. Obecność enzymów wraz ze zdolnością badanych bakterii do produkcji biosurfaktantów znacznie zwiększa zasobność i ułatwia pobór związków odżywczych przez rośliny. Istotną cechą badanych bakterii jest również wydzielanie kwasu indolilo-3-octowego, który jest hormonem roślinnym z grupy auksyn.

#### **Inokulacja gleby szczepami bakterii**

Inokulację gleby szczepami bakterii *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 prowadzi się w ten sposób, że bakterie dodawane są niezależnie do gleby w postaci zawiesiny o odpowiedniej liczebności mikroorganizmów. Bioaugmentacja gleby powinna być przeprowadzona w odpowiednim stosunku objętościowym zawiesiny bakteryjnej do gleby oraz w odpowiednim czasie poprzedzającym inne zabiegi np. sadzenie roślin.

Sposób inokulacji w korzystnej realizacji obejmuje następujące etapy:

- a) przygotowanie hodowli mikroorganizmów o odpowiedniej liczebności
- b) odwirowanie biomasy bakteryjnej
- c) zawieszenie biomasy bakteryjnej w roztworze soli fizjologicznej (NaCl 0,85%)
- d) zachowanie odpowiedniej proporcji objętości hodowli bakteryjnej do gleby

**Etap a)** W celu przeprowadzenia inokulacji/bioaugmentacji gleby szczepami bakterii *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 konieczne jest ich namnożenie (oddzielnie) na odpowiednim podłożu hodowlanym w celu uzyskania dostatecznej liczebności komórek, a następnie dodanie ich do gleby. Specjalista w dziedzinie będzie w stanie wybrać odpowiednie podłoże mikrobiologiczne do namnożenia komórek, przykładowo może być to podłoże płynne LB (Luria Bertani).

**Etap b)** W kolejnym etapie konieczne jest oddzielenie biomasy bakteryjnej od pozostałej cieczy poho-dowlanej. Separacja może być wykonana w dowolny znany w dziedzinie sposób, na przykład poprzez wirowanie w wirówce z prędkością 7000 rpm przez 8 minut.

**Etap c)** Następnym etapem jest oczyszczenie uzyskanej biomasy bakteryjnej z resztek podłoża płynnego i metabolitów bakterii. Etap ten powinien być wykonany za pomocą dwukrotnego przepłukiwania biomasy bakteryjnej roztworem soli fizjologicznej (NaCl 0,85%) w objętości identycznej jak objętość podłoża.

**Etap d)** Kolejnym krokiem jest ustalanie odpowiednich proporcji mieszania odwirowanych w etapie b) oraz zawieszonych w roztworze w etapie c) mikroorganizmów z glebą. Etap ten wymaga dokładnego określenia gęstości optycznej hodowli. Wartość optyczna gęstości hodowli (ang. *optical density*) mierzona przy długości fali równej 600 nm powinna wynosić 0,2 w przypadku *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B i *Psychrobacter* sp. ANT\_H59, natomiast 0,4 w przypadku *Bacillus* sp. ANT\_WA51. Przygotowane w powyższy sposób hodowle mikroorganizmów powinny być dodawane do gleby w proporcji 0,4 L/kg suchej masy gleby. Tak przeprowadzona inokulacja gleby spowoduje, że w glebie będzie znajdowało się ok.  $10^8$  jednostek tworzących kolonie/ml [JTK/ml]/g s.m. gleby.

#### **Zwiększanie biodostępności żelaza w glebie**

Następnym etapem jest zwiększenie biodostępności żelaza w glebie. Na skutek bioaugmentacji gleby szczepem *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B. W celu ustalenia zawartości biodostępnego żelaza w glebie przeprowadzono procedurę ekstrakcji zgodnie ze standardem ISO/DIS 14870. Spośród trzech wymienionych w wynalazku szczepów bakterii, tj.: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51, tylko *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zwiększała biodostępność żelaza w glebie o ~29% w stosunku do wariantów niebioaugmentowanych. Co więcej, inokulacja gleby szczepem ANT\_H12B skutkowała zwiększeniem zawartości żelaza w korzeniach roślin (lucerna – *Medicago sativa* L.) o ~14% w stosunku do roślin rosnących w nieinokulowanej glebie. Efekt zwiększenia biodostępności żelaza obserwowano po 28 dniach od inokulacji.

### Właściwości grzybobstatyczne

Kolejny etap dotyczy właściwości grzybobstatycznych szczepów *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51. Szczep ANT\_H12B wykazywał właściwości grzybobstatyczne przeciwko *Umbelopsis ramaniana*, podczas gdy *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 ograniczał wzrost grzybów z rodzaju *Trichoderma* sp. Szczep *Bacillus* sp. ANT\_WA51 wykazywał natomiast działanie grzybobstatyczne w stosunku do: *U. ramaniana*, *Umbelopsis isabelina*, *Thamnidium elegans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium tricinctum* i *Fusarium sporotrichioides*. Efekt grzybobstatyczny stwierdzono po 7 dniach obserwacji.

### Indukcja przyrostu biomasy roślin

Kolejny etap obejmuje zastosowanie szczepów: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 do indukcji przyrostu biomasy roślin (lucerna – *Medicago sativa* L.). Bioaugmentacja gleby zarówno szczepem *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 oraz *Bacillus* sp. ANT\_WA51 przyczyniała się do zwiększania biomasy pędów roślin hodowanych w glebie ogrodowej o kolejno: ~25%, ~22% i ~26% w stosunku do roślin hodowanych w glebie niebioaugmentowanej. Przyrost biomasy korzeni odnotowano jedynie w przypadku zastosowania szczepu *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, który wynosił ~40% względem kontroli. Zastosowanie szczepów *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 nie wpłynęło istotnie na przyrost biomasy części podziemnych roślin. Obserwacje przeprowadzono po 21 dniach eksperymentu.

Szczepy ANT\_H12B, ANT\_H59 i ANT\_WA51 mogą zostać wykorzystane do zwiększania biomasy nadziemnych części roślin, np. pastewnych, zielarskich czy spożywczych. Bioaugmentacja gleby szczepem ANT\_H12B może zostać dodatkowo wykorzystana do zwiększania biomasy roślin, dla których rozwój korzeniowy odgrywa szczególnie istotną rolę. Przykładem takich roślin mogą być korzeniowe rośliny uprawne takie jak np. marchew, pietruszka, burak ćwikłowy czy rzodkiew. Zastosowanie zimnolubnych bakterii pozwala na zastosowanie wynalazku we wczesnych okresach wegetacji roślin – w warunkach niskich temperatur i przymrozków.

### Inne własności

Dodatkowo wykazano szereg cech badanych szczepów, które przyczyniają się do promocji wzrostu roślin. *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B oraz *Bacillus* sp. ANT\_WA51 rozpuszczają nieorganiczne związki fosforu (np.  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), degradować celulozę i wytwarzają hormony roślinne, takie jak kwas indolooctowy (IAA). ANT\_H12B posiada ponadto zdolność do denitryfikacji związków azotowych, natomiast ANT\_WA51 wykazuje właściwości proteolityczne. Co więcej, *Psychrobacter* ANT\_H59 i *Bacillus* ANT\_WA51 rozkładają lipidy i produkują biosurfaktanty. Co istotne, wszystkie trzy przedstawione w wynalazku szczepy wytwarzają syderofory.

Zatem rozwiązanie według wynalazku obejmuje sposób bioaugmentacji gleby nowymi szczepami bakterii, który prowadzi do: i) zwiększenia biodostępności żelaza w glebie, ii) chroni rośliny przed patogenami, a także iii) wywiera korzystny wpływ na przyrost biomasy roślin.

### Opis figur

Dla lepszego zrozumienia wynalazku, został on zilustrowany w nieograniczających przykładach wykonania oraz na załączonych figurach rysunku, na których:

**Fig. 1** przedstawia analizę długości pędów roślin hodowanych przez 21 dni na glebie bioaugmentowanej szczepem bakterii: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51, a także na glebie nie poddanej bioaugmentacji.

**Fig. 2** przedstawia analizę biomasy pędów roślin hodowanych przez 21 dni na glebie bioaugmentowanej szczepem bakterii: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51, a także na glebie nie poddanej bioaugmentacji.

**Fig. 3** przedstawia analizę biomasy korzeni roślin hodowanych przez 21 dni na glebie bioaugmentowanej szczepem bakterii: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51, a także na glebie nie poddanej bioaugmentacji.

**Fig. 4** przedstawia analizę zawartości biodostępnego żelaza, po 21 dniach obserwacji, w glebie bioaugmentowanej szczepem bakterii: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51, a także niepoddanej bioaugmentacji.

**Fig. 5** przedstawia analizę zawartości żelaza w korzeniach roślin hodowanych przez 21 dni na glebie bioaugmentowanej szczepem bakterii: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51, a także nie poddanej bioaugmentacji.

**Przykład 1. Promowanie wzrostu roślin hodowanych pod wpływem bioaugmentacji gleby szczepem bakterii: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51.**

W prezentowanym przykładzie wykorzystano glebę ogrodową, której inokulację szczepami *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 przeprowadzono zgodnie z wyżej opisaną procedurą, a także roślinę – lucernę siewną (*Medicago sativa* L.), odmianę Tango. Odczyn gleby był lekko kwaśny i wynosił 6,85. Rośliny, które posadzono do gleby wzbogaconej mikroorganizmami, zostały najpierw poddane hodowli wstępnej. Nasiona roślin lucerny zostały posadzone do gleby bez dodatku mikroorganizmów i były w niej inkubowane przez 7 dni. Hodowlę wstępną przeprowadzono w doniczkach zawierających 2 kg gleby. Po tym czasie, młode rośliny zostały przesadzone do wcześniej przygotowanej gleby, którą poddano bioaugmentacji przedstawionymi w wynalazku szczepami. Szczepy inokulowano osobno. Eksperyment ten prowadzono w jednakowych doniczkach zawierających po 2 kg gleby dla każdego z wariantów, tj: i) kontrolnego, ii) bioaugmentowanego ANT\_H12B, iii) bioaugmentowanego ANT\_H59 oraz iv) bioaugmentowanego szczepem ANT\_WA51. Każdy wariant wykonano w trzech donicach (powtórzeniach), zawierających po 25 roślin = łącznie 75 dla danego wariantu. Wyniki uzyskane po 21 dniach eksperymentu przedstawiono na Fig. 1, 2 i 3.

Wykazano, że bioaugmentacja gleby szczepem *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 przyczyniła się do wzrostu ogólnej biomasy pędów o kolejno: ~25%, ~22% i ~26% względem roślin hodowanych na glebie niebioaugmentowanej. Wzrost biomasy korzeni zaobserwowano jedynie w przypadku roślin rosnących na glebie bioaugmentowanej szczepem ANT\_H12B i była ona wyższa o ~40% względem kontroli.

**Przykład 2. Zwiększanie biodostępności żelaza w glebie pod wpływem bioaugmentacji gleby szczepem *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B.**

W podanym przykładzie, w celu określenia zawartości biodostępnego żelaza w glebie, przeprowadzono procedurę ekstrakcji zgodnie z międzynarodowym standardem ISO/DIS 14870. Roztwór ekstrakcyjny zawierał mieszaninę: 0,005 M DTPA (kwasu dietylenotriaminopentaoctowego), 0,01 M CaCl<sub>2</sub> i 0,1 M TEA (trietyloaminy); zbuforowaną do pH 7,3. Do 2 ml roztworu ekstrakcyjnego dodano 1 g wysuszonej na powietrzu gleby i wytrząsano przez dwie godziny. Ekstrakty następnie przesączono przez filtry 0,21 µm i poddano dalszej analizie z wykorzystaniem atomowej spektrometrii adsorpcyjnej. Jako kontrolny roztwór do ekstrakcji zastosowano wodę destylowaną. Wszystkie ekstrakcje przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Po 21 dniach obserwacji wykazano, że zawartość biodostępnego żelaza w glebie wzrosła o 29% w stosunku do gleby niepoddanej bioaugmentacji. Dodatkowo, lucerna siewna (*Medicago sativa* L.), hodowana w glebie bioaugmentowanej szczepem ANT\_H12B przez 21 dni (analogicznie jak w przykładzie nr. 1), zawierała podwyższoną zawartość żelaza w części korzeniowej – o ~14% względem roślin hodowanych w glebie niebioaugmentowanej. Analizę również wykonano atomową spektroskopią adsorpcyjną. Wyniki przedstawiono na Fig. 4 i 5.

Deficyt biodostępnego żelaza w glebie stanowi często czynnik limitujący wzrost roślin. Bioaugmentacja gleby szczepem ANT\_H12B zwiększa biodostępność żelaza w glebie, co przekłada się na jego wyższą zawartość w korzeniach roślin.

**Przykład 3. Aktywność grzybobójcza szczepów bakterii: *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51**

W podanym przykładzie zbadano aktywność grzybobójczą szczepów: ANT\_H12B, ANT\_H59 i ANT\_WA51. W tym celu wykorzystano dwanaście szczepów grzybów chorobotwórczych dla roślin tj.: *Umbelopsis ramaniana* (WA71880), *U isabelina* (WA71875), *Thamnidium elegans* (WA18081), *Aspergillus niger* (WA50716), *A. ochraceus* (WA72081), *Penicillium expansum* (WA72081), *Botrytis cinerea* (WA72082), *Alternaria* sp. (WA67128), *Cladosporium* sp. (WA72809), *Trichoderma* sp. (WA50717), *Fusarium tricinctum* (WA67200) i *F. sporotrichioides* (WA67190), które uzyskano z Herbarium Universitatis Varsoviensis; Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Warszawskiego (WABG) (Polska). Grzyby hodowano na pożywce PDA (Dennis i Webster 1971) przez 7 dni w 20°C. Po inkubacji, w centrach nowych płytek zawierających podłoże PDA umieszczono po 1 cm wyciętych fragmentów grzybni, a następnie w sterylnych cylindrach zaszczepiono punktowo po 10 µl hodowli bakteryjnych (10<sup>8</sup> CFU/ml) i kontroli (czyste podłoże hodowlane). Szalki z fragmentem grzybni i wprowadzonymi hodowlami bakterii inkubowano przez 7 dni w temperaturze 20°C. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Szczep *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B wykazywał właściwości hamujące przeciwko *U. ramaniana*, podczas gdy *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 ograniczał wzrost *Trichoderma* sp. *Bacillus* sp.

ANT\_WA51 hamował natomiast wzrost wszystkich przebadanych grzybów, tj. *U. ramaniana*, *U. isabellina*, *T. elegans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *F. tricinctum* i *F. sporotrichioides*.

Aktywność grzybobójcza przedstawionych szczepów bakterii stanowi istotny czynnik promujący wzrost roślin przekładający się bezpośrednio na znaczne zmniejszenie strat w uprawach powodowanych przez chorobotwórcze grzyby. Zastosowanie szczepów bakterii o właściwościach grzybobójczych jest również obiecującą alternatywą do powszechnie stosowanych chemicznych fungicydów.

**Przykład 4. Cechy szczepów *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 przyczyniające się do promocji wzrostu roślin**

Kolejny przykład przedstawia analizę cech badanych szczepów bakterii, użytecznych w promocji wzrostu roślin.

- a. Aby określić zdolność do produkcji i ilość wytwarzanych syderoforów, bakterie hodowano przez 7 dni w pożywce GASN (Bultreys and Gheysen 2000) w temperaturze 20°C (z wytrząsaniem obrotowym 150 obrotów/min). Początkowa gęstość optyczna przy długości fali 600 nm ( $OD_{600}$ ) wynosiła 0,1. Po 7 dniach hodowli bakterie odwirowano (6000 obr./min przez 5 min), a supernatanty zmieszano w stosunku 1 : 1 z odczynnikiem Chrome Azurol S (CAS). Pożywkę GASN zastosowano jako kontrolę negatywną, a sól mesylanu deferoksaminy, o stężeniu 0,025 mM, jako kontrolę pozytywną. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Po godzinie inkubacji zmierzono absorbancję przy długości fali 630 nm za pomocą automatycznego czytnika mikroplitek.
- b. W celu określenia zdolności do produkcji biosurfaktantów, hodowle bakteryjne hodowano przez 7 dni na pożywce LB w 20°C (z wytrząsaniem obrotowym 150 obrotów/min) w dwóch wariantach, tj: i) z dodatkiem 1% (w/v) oleju słonecznikowego oraz ii) bez suplementacji olejem. Początkowa gęstość optyczna przy długości fali 600 nm wynosiła 0,1. Kontrolą były niezaszczepione podłoża hodowlane; wszystkie warianty przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Po 7 dniach hodowli bakterie odwirowano (6000 obr/min przez 5 min), a supernatanty zbadano metodą pierścieniową (metoda du Nouy) przy wykorzystaniu tensjometru.
- c. Zdolność do wytwarzania kwasu indoloocetowego (IAA) określono stosując podłoże LB z dodatkiem 5 mM tryptofanu. Zaszczepione hodowle inkubowano w 20°C z wytrząsaniem obrotowym 150 obrotów/min, w ciemności. Po 7 dniach inkubacji hodowle odwirowano (6000 obr/min przez 5 min), supernatanty zmieszano z odczynnikiem Salkowskiego (0,5 M FeCl<sub>3</sub> + 35% kwas nadchlorowy) w stosunku 4 : 1 i zmierzono absorbancję przy długości fali 530 nm. Jako kontrolę zastosowano kwas indolo-3-octowy i niezaszczepione pożywki hodowlane. Eksperyment wykonany został w trzech powtórzeniach.
- d. Zdolność do rozkładu mocznika przez ANT\_H12B, ANT\_H59 i ANT\_WA51 sprawdzono stosując pożywkę LB uzupełnioną 1% (w/v) mocznikiem i 0,01% (v/v) czerwieni fenolową. Zaszczepione podłoża hodowano następnie przez 7 dni w 20°C z wytrząsaniem obrotowym 150 obrotów/min. Początkowa gęstość optyczna przy długości fali 600 nm wynosiła 0,1. Uzupełniona pożywka, ze względu na obecność amoniaku i wyższe pH, zmieniała kolor na różowy. Zmiany pH dodatkowo potwierdzono pH-metrem. Jako kontrole wykorzystano: i) zaszczepione bakteriami LB uzupełnione 0,01% czerwieni fenolową; ii) zaszczepione LB uzupełnione 1% mocznikiem; iii) niezaszczepione LB z dodatkiem 1% mocznika i 0,01% czerwieni fenolowej. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach.
- e. Zdolność przedstawionych w wynalazku szczepów bakterii do solubilizacji nieorganicznych fosforanów (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) oszacowano przy użyciu pożywki NBRIP (pożywka fosforanowa do wzrostu National Botanical Research Institute) (Nautiyal 1999). Hodowle hodowano przez noc ( $OD_{600} = \sim 0,5$ ) i zaszczepiano punktowo w trzech powtórzeniach po 5  $\mu$ l na płytkach. Bakterie następnie inkubowano w 20°C przez 7 dni. Obecność strefy przejaśnienia wokół obszarów wzrostu bakterii wskazywała na potencjał solubilizacji nieorganicznego fosforanu.
- f. W celu przetestowania zdolności do redukcji azotanów, Tryptonowy Agar Sojowy, suplementowany 1% KNO<sub>3</sub> (w/v) zaszczepiono szczepem ANT\_H12B, ANT\_H59 i ANT\_WA51, a następnie zalano 1% agarem w celu uzyskania około 2 cm stałej warstwy agaru. Początkowa gęstość optyczna hodowli przy długości fali 600 nm wynosiła 0,1. Bakterie następnie hodowano przez 7 dni bez wstrząsania. Pęcherzyki gazu wskazywały na obecność tlenu azotu NO<sub>2</sub>.
- g. Aktywność celulolityczną badanych w wynalazku bakterii testowano na szalkach z pożywką Mandelsa i Reese'a (Mandels i Reese 1957) zawierającą karboksymetylocelulozę (CMC). Nocne

hodowle (gęstość optyczna przy długości fali 600 nm = ~0,5) zaszczepiono punktowo w trzech powtórzeniach po 5 µl na płytkach z podłożem, a następnie inkubowano w 20°C przez 7 dni. Po upływie czasu inkubacji, płytki zalano wodnym roztworem czerwieni Kongo (1 mg/ml) na 15 min. Po upływie czasu czerwień Kongo zlane, a strefy hydrolizy zwizualizowano przez zalanie płytek 1 M HCl.

- h. Aby wykazać aktywność proteolityczną szczepów, bakterie hodowano przez noc ( $OD_{600} = \sim 0,5$ ) i nakrapiano punktowo w trzech powtórzeniach na płytkach agarowych LB uzupełnionych 1% (w/v) odtłuszczonym krowim mlekiem. Obecność strefy przejaśnienia wokół obszarów wzrostu bakterii wskazywała na aktywność proteolityczną.
- i. Aktywność lipolityczną szczepów testowano na podłożu Egg-Yolk Agar, na którym bakterie hodowane przez noc ( $OD_{600} = \sim 0,5$ ) zaszczepiano punktowo w trzech powtórzeniach po 5 µl. Po 7 dniach inkubacji, płytki zalano nasyconym roztworem  $CuSO_4$  i pozostawiono na 20 minut do barwienia. Następnie nadmiar roztworu usunięto, a zielonkavo-niebieski kolor potwierdził zajście procesu lipolizy.

Wszystkie badane szczepy wykazały potencjalne użyteczne cechy w promocji wzrostu roślin. Badania wykazały, że *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B oraz *Bacillus* sp. ANT\_WA51, rozpuszczają nieorganiczne związki fosforu (np.  $Ca_3(PO_4)_2$ ), posiadają zdolność do degradacji celulozy i wytwarzają kwas indolooctowy (IAA). ANT\_H12B przeprowadza również proces denitryfikacji, natomiast ANT\_WA51 wykazuje właściwości proteolityczne. Co więcej, *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 i *Bacillus* sp. ANT\_WA51 rozkładają lipidy i wytwarzają biosurfaktanty. W przypadku pożywki LB z dodatkiem oleju i zaszczepionej szczepem ANT\_H59 napięcie międzyfazowe zmniejszyło się z 55 ( $\pm 1$ ) do 32 ( $\pm 1$ ) mN/m. *Bacillus* sp. ANT\_WA51 wytwarza natomiast konstytutywnie biosurfaktanty na podłożu LB bez dodatku oleju i obniża napięcie powierzchniowe z 55 ( $\pm 1$ ) do 26 ( $\pm 1$ ) mN/m. Wszystkie trzy badane szczepy wytwarzają syderofory, których stężenia porównywano w stosunku do mesylatu desferioksaminy. Maksymalna zdolność do produkcji syderoforów ustalona w stosunku do ilości wykorzystanej wzorcowej desferioksaminy to (mM): 1,065 ( $\pm 0,09$ ) z ANT\_H12B, 0,188 ( $\pm 0,005$ ) z ANT\_H59 i 0,305 ( $\pm 0,028$ ) z ANT\_WA51.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00321.
2. Szczep *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00322.
3. Szczep *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00320.
4. Kompozycja do bioaugmentacji gleby zawierająca szczep *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00321 i/lub *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00322, i/lub *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00320.
5. Zastosowanie szczepów jak określono w zastrz. 1–3 do promocji wzrostu roślin, przyrostu biomasy roślin, ochrony roślin przed patogenami oraz zwiększenia biodostępności żelaza w glebie.
6. Sposób bioaugmentacji gleby **znamienny tym**, że glebę inokuluje się szczepem psychrotolerancyjnym *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowanym w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00321 i/lub *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowanym w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00322, i/lub *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowanym w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod numerem B/00320.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że proces inokulacji obejmuje następujące etapy:
  - a) namnożenie bakterii na podłożu hodowlanym
  - b) oddzielenie biomasy bakteryjnej od podłoża
  - c) oczyszczenie bakteryjnej biomasy z podłoża i resztek metabolitów bakterii

- d) ustalenie odpowiedniej proporcji objętości hodowli bakteryjnej do gleby  
e) dodanie biomasy bakteryjnej do gleby
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że bakterie namnaża się w podłożu płynnym.
  9. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że biomasę oczyszcza się roztworem soli fizjologicznej NaCl 0,85%.
  10. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że wartość optyczna gęstości hodowli mierzona przy długości fali równej 600 nm wynosi 0,2 dla szczepu *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B zdeponowanego pod nr B/00321 i *Psychrobacter* sp. ANT\_H59 zdeponowanego pod nr. B/00322, i 0,4 dla szczepu *Bacillus* sp. ANT\_WA51 zdeponowanego pod nr. B/00320.
  11. Sposób, według zastrz. 7, **znamienny tym**, że hodowle mikroorganizmów dodaje się do gleby w proporcji 0,4 L/kg suchej masy gleby.

## Rysunki

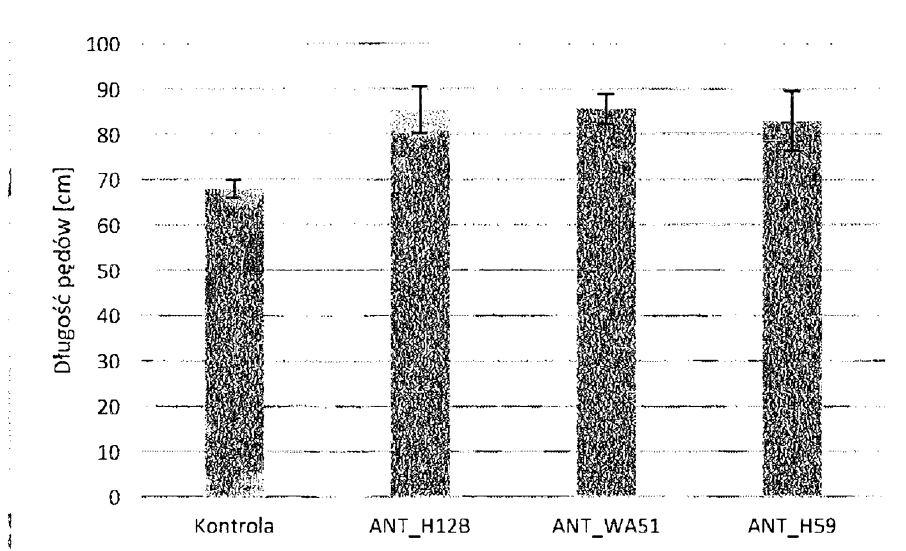


Fig. 1

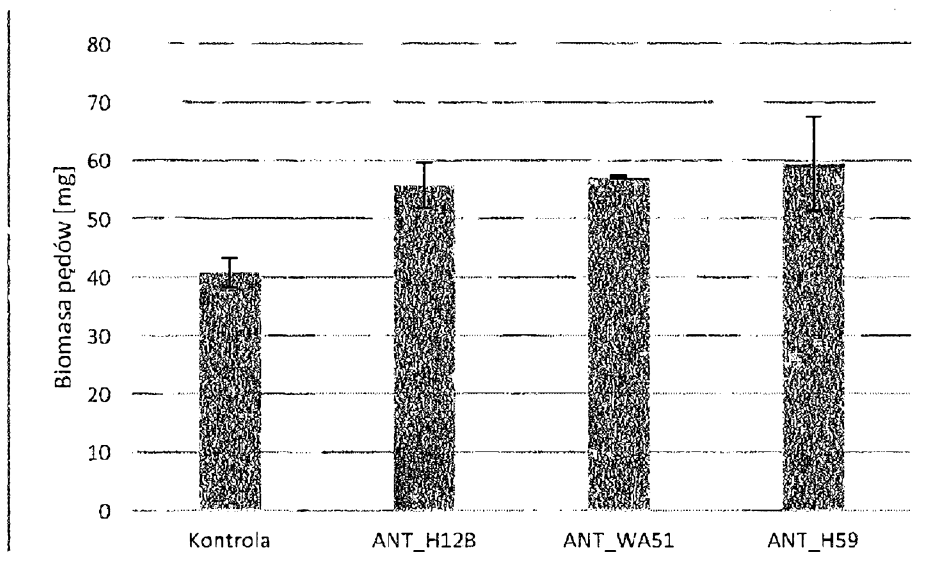


Fig. 2

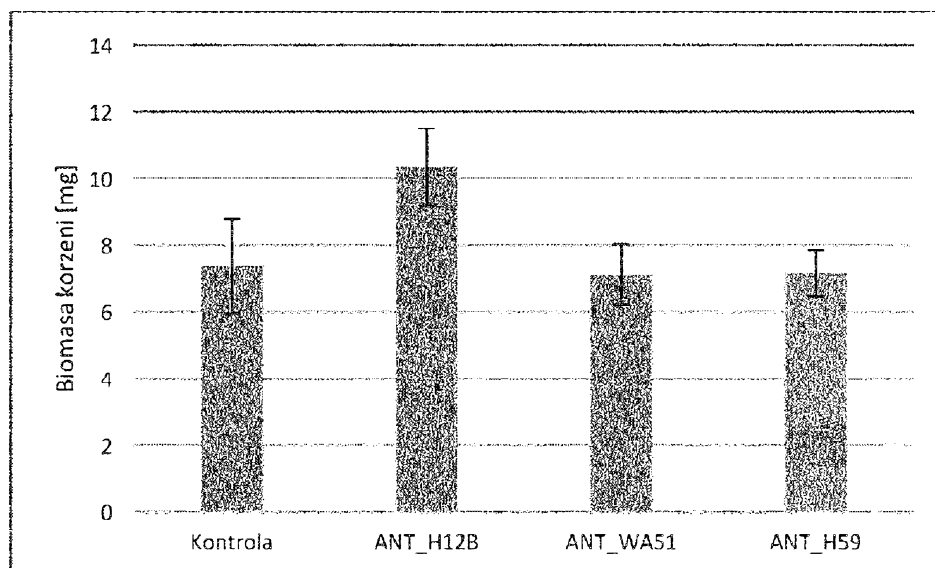


Fig. 3

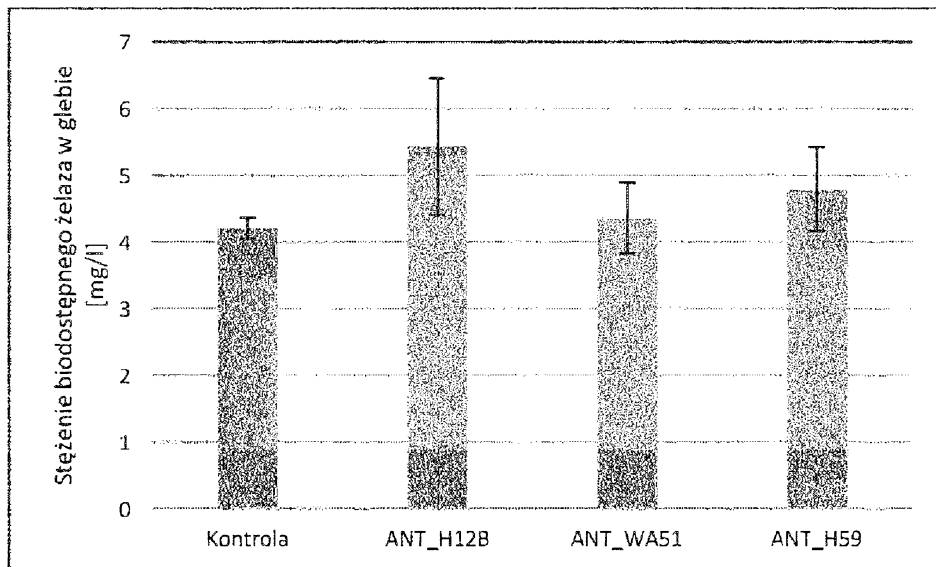


Fig. 4

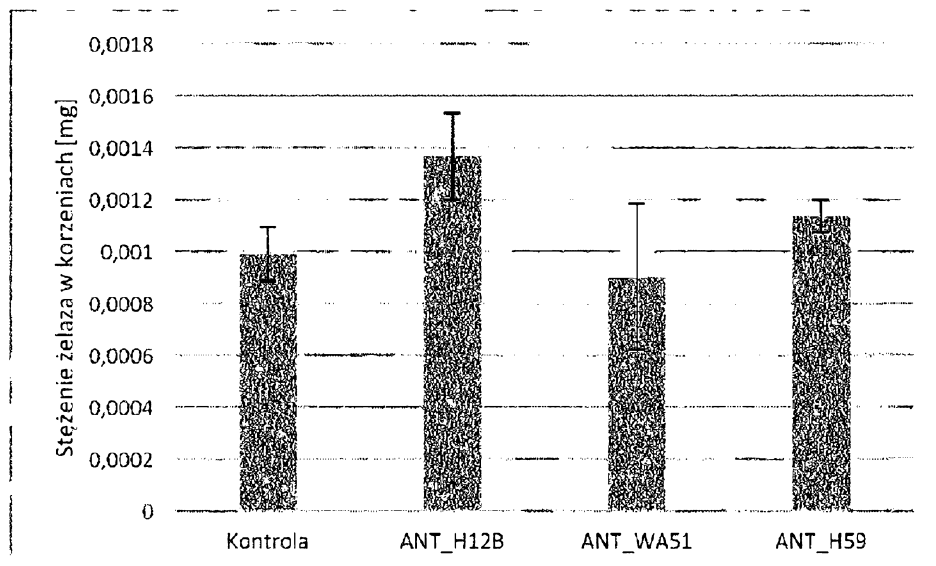


Fig. 5