

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 247144 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444773**

(22) Data zgłoszenia: **2023.05.02**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.05.19 WUP 20/2025**

(51) MKP:

C05F 11/08 (2006.01)

A01N 63/22 (2020.01)

A01N 63/27 (2020.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**SIEĆ BADAWCZA ŁUKASIEWICZ – INSTYTUT
INŻYNIERII MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH
I BARWNIKÓW, Toruń, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**KATARZYNA JANCZAK, Piecowo, PL
KACPER FIEDUREK, Inowrocław, PL
NATALIA PUSZCZYKOWSKA, Czyste, PL
DARIA LISEWSKA, Machnacz, PL
ALICJA MAZURYK, Toruń, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Jan Michalak, Toruń, PL

(54) Tytuł:

**Biokompozyt i sposób otrzymywania biokompozytu do poprawy jakości biologicznej gleby
oraz zastosowanie biokompozytu**

PL 247144 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biokompozyt i sposób otrzymywania biokompozytu do poprawy jakości biologicznej gleby oraz zastosowanie biokompozytu, zwłaszcza w ogrodnictwie i rolnictwie.

Środki nawozowe, poprawiające właściwości gleby, stymulatory wzrostu roślin mogą mieć formę płynną lub stałą (sygką w formie proszku lub granulatu). Forma stała produktu pozwala na dłuższy termin przydatności gotowego produktu, ułatwia logistykę dzięki mniejszym i lżejszym opakowaniom. Forma granulatu wprowadza możliwość zastosowania nośnika, który może dodatkowo poprawiać właściwości produktu, np. zapewniać odpowiednie pH, pozytywnie wpływać na żywotność mikroorganizmów lub poprzez zawartość odpowiednich mikro- i makroelementów pozytywnie wpływać na parametry gleby. Obecne na rynku produkty dogłebowe możemy podzielić na enzymatyczne, mikrobiologiczne i mikrobiologiczno-enzymatyczne.

Najważniejszymi funkcjami mikroorganizmów glebowych w tym bakterii jest: rozkład i mineralizacja materii organicznej, rozkład i detoksykacja różnych substancji zanieczyszczających glebę, ograniczenie rozwoju szkodników i patogenów roślin, tworzenie układów symbiotycznych z roślinami. Wśród wyselekcjonowanych szczepów bakterii odgrywających kluczową rolę w środowisku glebowym znalazły się m.in. bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, czy *Serratia* i *Arthrobacter* [1–3]. Dostępne są również preparaty mikrobiologiczne: bakteryjne stymulujące wzrost i plonowanie roślin bobowatych (motylkowatych), czy grzybiczne stosowane do mikoryzacji sadzonek w szkółkach leśnych [4].

Z polskiego opisu patentowego PL 234499 B1 znana jest kompozycja wyizolowanych szczepów saprofitycznych bakterii glebowych oraz biopreparat zawierający taką kompozycję mający zastosowanie do zwalczania patogenów roślinnych w glebie i przywracania naturalnej równowagi biologicznej mikroflory oraz biostymulacji rozwoju i wzrostu roślin w sposobach i zastosowaniach je wykorzystujących. Kompozycja zawiera 8 szczepów saprofitycznych bakterii glebowych reprezentujących rodzaje: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, która zawiera wyizolowane szczepy *Arthrobacter* sp. szczep 1.4, *Bacillus* sp. szczep 202B, *Bacillus* sp. szczep 233, *Bacillus* sp. szczep 307A, *Citrobacter* sp. szczep 6A, *Paenibacillus* sp. szczep 45, *Pseudomonas* sp. szczep 23 (W), *Pseudomonas* sp. szczep 60 (W) oraz biopreparat zawierający taką kompozycję, jak i sposób ich wytwarzania. Przedmiotem wynalazku są również sposoby zwalczania patogenów roślin w glebie, użyźniania gleby i przywracania naturalnej równowagi biologicznej mikroflory gleby, biostymulacji rozwoju i wzrostu roślin oraz zastosowania do zwalczania patogenów roślin w glebie, do użyźniania gleby i przywracania naturalnej równowagi biologicznej mikroflory gleby, do biostymulacji rozwoju i wzrostu roślin wykorzystujące kompozycję i biopreparat zawierający 8 współdziałających ze sobą szczepów.

Z polskiego opisu patentowego PL 237050 (P.427073) znany jest sposób otrzymywania preparatu biologicznego pochodzenia grzybicznego przyspieszający degradację tworzyw polimerowych polegający na tym, że przygotowuje się zawiesinę spor grzyba *Trichoderma viride* 3333 z czystej korzystnie czternastodniowej kultury grzyba prowadzonej w zakresie temperatur od 20°C do 25°C, po czym grzybnę przenosi się na filtr o wielkości por 22–25 µm i przepłukuje sterylną wodą, aż do uzyskania zawiesiny o gęstości spor w zakresie od 106 do 108/ml, a następnie zawiesinę spor miesza się z roztworem alginianu sodu korzystnie 0,7% i wkrapla do roztworu CaCl₂ w zakresie 2–3,5%. Przedmiotem zgłoszenia jest także preparat biologiczny pochodzenia grzybicznego, który przygotowuje się z mikrokapsulek alginianowych zawierających spory grzyba w ilości od 106 do 108/ml poprzez zmieszanie z 3% chlorkiem wapnia w stosunku 2 : 1.

Z opisu patentowego PL 237981 znana jest biodegradowalna kompozycja polisacharydowa zawierająca skrobię termoplastyczną przeznaczoną na opakowania do świeczek zawierająca glicerynę w ilości od 0,1 do 10 części wagowych na 100 części wagowych skrobi termoplastycznej, montmorylonit w ilości od 0,1 do 10 części wagowych na 100 części wagowych skrobi termoplastycznej oraz fosforan melaminy w ilości 0,1 do 20 części wagowych na 100 części wagowych skrobi termoplastycznej.

Z kolei z opisu patentowego PL 216930 znany jest sposób dwuetapowego wytwarzania termoplastycznej skrobi, przez zmieszanie skrobi natywnej z plastyfikatorem i wytłoczenie. W pierwszym etapie skrobię natywną w ilości 50–80 części wagowych miesza się w temperaturze 60–100°C z 20–50 częściami wagowymi gliceryny i przeprowadza w suchą mieszaninę z jednoczesnym odprowadzeniem wody, a w drugim etapie kondycjonowaną suchą mieszaninę przeprowadza się w stan uplastyczniony poddając

ją działaniu sił ścinających w temperaturze 130–150°C i wytłacza w temperaturze 150–180°C z równoczesnym odgazowaniem części lotnych a następnie granuluje.

Z polskiego opisu patentowego PL 236495 znany jest sposób wytwarzania granulatu nawozu wapniowego i/lub wapniowo-magnezowego pojedynczego lub wieloskładnikowego, polegający na tym, że granulowaniu poddaje się sypki materiał wapienny i/lub dolomitowy, którym jest: mączka wapienna, lub mączka wapienna z dodatkiem mączki dolomitu i/lub mączki kredy i/lub gipsu, lub mączka dolomitu, lub mączka dolomitu z dodatkiem mączki wapiennej i/lub mączki kredy, i/lub gipsu, lub mączka kredy, lub mączka kredy z dodatkiem mączki wapiennej i/lub mączki dolomitu i/lub gipsu, przygotowany w zasobniku dozującym, który wprowadza się w sposób ciągły do obracającego się granulatora i na przesypujący się w bębnie lub talerzu materiał natryskuje się jednocześnie w sposób ciągły roztwór środka wiążącego, którym jest wodny roztwór lignosulfonianu magnezu o stężeniu $1 \div 60\%$, przy czym stosuje się 0,10–0,20 kg roztworu lignosulfonianu magnezu/kg materiału wapiennego i/lub dolomitowego, korzystnie 0,12–0,15 kg roztworu/kg materiału i granuluje się w procesie ciągłym, a wytworzony granulat odbiera do leja wysypowego, suszy i oddziela się produkt gotowy.

Biokompozyt do poprawy jakości biologicznej gleby według wynalazku polega na tym, że zawiera co najmniej 36 części wagowych skrobi ziemniaczanej lub kukurydzianej albo pszennej, od 15 do 25 części wagowych gliceryny, od 10 do 20 części wagowych oleju palmowego, od 10 do 14 części wagowych mocznika, od 2 do 5 części wagowych mączki wapiennej oraz liofilizat szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* w ilości od 0,001 do 0,010 części wagowych liofilizatu na 100 części wagowych granulowanego biokompozytu.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania biokompozytu do poprawy jakości biologicznej gleby, który według wynalazku polega na tym, że do co najmniej 36 części wagowych skrobi ziemniaczanej lub kukurydzianej albo pszennej wprowadza się: od 15 do 25 części wagowych gliceryny, od 10 do 20 części wagowych oleju palmowego, od 10 do 14 części wagowych mocznika, od 2 do 5 części wagowych mączki wapiennej które miesza się, po czym w znany sposób wytłacza się w zakresie temperatur 50°C do 90°C, kolejno wytłoczoną granulację, następnie biokompozyt w formie granulatu miesza się z liofilizatami szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* w ilości od 0,001 do 0,010 części wagowych liofilizatu na 100 części wagowych granulowanego biokompozytu, po czym tak otrzymany biokompozyt z liofilizatami niezwłocznie umieszcza się w szczelnym opakowaniu.

Istotą wynalazku jest również to, że sporządza się zawiesiny każdego ze szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* oddzielnie w sterylnej soli fizjologicznej o mętności roztworu 2,0 McF, co odpowiada teoretycznej gęstości optycznej 550 nm wynoszącej 0,5 i liczebności około 600×10^6 jtk/ml, które to zawiesiny w warunkach sterylnych nanosi się na powierzchnię zestaloną pełnowartościową pożywkę agarową, którą to rozprowadza się równomiernie po powierzchni agaru i inkubuje się w czasie 24–48 godzin w temperaturze 23–29°C, aż do momentu co najmniej 50% porośnięcia powierzchni pożywki agarowej, z kolei po inkubacji wyrosłe kolonie szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* zebrane z powierzchni agarowej pożywki liofilizuje się w formie kultury mieszanej w czasie od 4 godzin do 12 godzin w próżni 0,5 mbar i temperaturze od –40 do –80°C, uzyskując przeżywalność bakterii wynoszącą przynajmniej $2,0 \times 10^5$ jtk na 1 mg liofilizatu.

Wynalazek dotyczy również zastosowania biokompozytu do poprawy jakości biologicznej gleby poprzez implementację granulowanego biokompozytu z liofilizatami szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus*.

Nieoczekiwanie okazało się, że otrzymany sposobem według wynalazku biokompozyt na bazie skrobi zawierający glicerynę, olej palmowy, mocznik i mączkę wapienną w połączeniu z liofilizatami szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* znajduje zastosowanie jako produkt doglebowy.

Przedmiot wynalazku wyjaśnia bliżej poniższy przykład realizacji, nie ograniczając jego zakresu.

P r z y k ł a d

Biokompozyt otrzymano przez wymieszanie w mieszalniku elektrycznym komponentów w formie sypkiej o składzie jakościowym i ilościowym przedstawionym w Tabeli 1.

Tabela 1

L.p.	Nazwa	Ilość
1.	Skrobia ziemniaczana (Standard a)	36 g
2.	Gliceryna roślinna destylowana techniczna 99,8%	25 g
3.	Olej palmowy Goldpalm	20 g
4.	Mocznik Pulrea (zawartość całkowita azotu 46%, uziarnienie 1-4 mm)	14 g
5	Mączka wapienna (pozostałość na sicie 45 μ m max. 4%, zawartość CaCO ₃ min. 96%)	5 g

Wytworzoną jak wyżej mieszaninę zadozowano do wycłaczarki dwuślimakowej współbieżnej o za-
zębiających się ślimakach, każdy o długości co najmniej $L = 40 D$, gdzie D to średnica ślimaków umiesz-
czonych w cylindrze wycłaczarki, w którym to układzie uplastyczniającym wycłaczarki następuje upla-
stycznienie mieszaniny pod wpływem działania sił ścinających i temperatury stref grzejnych w zakresie
temperatur 54°C do 75°C, następnie tak uplastycznioną i zhomogenizowaną mieszaninę wytłoczono
przy szybkości obrotowej ślimaków 200 obr./min. Schłodzoną wytłoczoną biokompozytu zgranulowano
na urządzeniu granulującym.

Liofilizacji poddano szczepy bakterii mezofilnych takich jak w Tabeli 2.

Tabela 2

L.p.	Oznaczenie szczepu	Rodzaj bakterii
1.	PCM 3107	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
2.	KKP 1699	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
3.	PCM 2019	<i>Bacillus cereus</i>

Sporządzono zawiesiny każdego ze szczepów bakterii mezofilnych (Tabela 2) w sterylnej soli
fizjologicznej o mętności roztworu 2,0 McF, co odpowiada teoretycznej gęstości optycznej 550 nm wy-
noszącej 0,5 i liczebności około 600×10^6 jtk/ml. Następnie po 1 ml każdej zawiesiny przenoszono
w warunkach sterylnych na płytki Petriego o średnicy ok. 90 mm zawierające 15–25 ml zestalonej peł-
nowartościowej pożywki agarowej tryptonowo-sojowej (TSA – Tryptone Soya Agar). Naniesiony 1 ml
zawiesiny rozprowadzono równomiernie gładką mikrobiologiczną po powierzchni agaru i inkubo-
wano w czasie 24–48 godzin w temperaturze 26°C, aż do momentu całkowitego porośnięcia po-
wierzchni pożywki agarowej. Dla każdego szczepu przygotowano po 10 płytek Petriego. Po inkubacji
wzrosłe kolonie bakteryjne z każdej płytki Petriego zebrano gładką mikrobiologiczną i naniesiono na
wspólną dla wszystkich płaską szklaną płytkę. Taką otrzymaną kulturę mieszaną, poddano procesowi
liofilizacji przez 6 godzin w próżni 0,5 mbar i temperaturze w trakcie procesu wynoszącej –60°C, uzy-
skując przeżywalność bakterii wynoszącą $2,0 \times 10^8$ jtk na 1 mg liofilizatu. Następnie oznaczono ogólną
liczebność mikroorganizmów (OLD) metodą seryjnych rozcieńczeń, posiewając roztwory z rozcieńczeń
dziesiętnych na podłożu agarowe PCA (Potatoe Dextrose Agar). Po 48 godzinach inkubacji w tempera-
turze 26°C oznaczono liczebność bakterii wynoszącą $8,0 \times 10^8$ jtk/ml.

Uprzednio uformowany granulat biokompozytu o regularnym kształcie i wielkości 5,0 mm zmie-
szano i rozdrobniono w młynku elektrycznym z liofilizatami szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomo-
nas fluorescens* (PCM 3107) i *Pseudomonas fluorescens* (KKP 1699) i *Bacillus cereus* (PCM 2019)
w ilości 0,005 części wagowych liofilizatu na 100 części wagowych biokompozytu, po czym tak otrzy-
many produkt tj. biokompozyt z liofilizatami niezwłocznie umieszczono w szczelnym opakowaniu.

Biokompozytowy produkt w ilości 100 g równomiernie, w sposób manualny posypano na po-
wierzchnię gleby ogrodniczej. Wielkość obszaru wynosiła 10 m², po czym obszar ten przekopano na

głębokość ok. 20 cm, następnie podlano bieżącą wodą wodociągową. Przed posypaniem powierzchni gleby pobrano próbkę gleby do badania ogólnej liczebności mikroorganizmów, ogólnej liczebności bakterii, ogólnej liczebności grzybów, potencjału redoks. Próbki pobierano po 7 i 28 dniach od implementacji. Określano ogólną liczebność bakterii i grzybów z tą różnicą, że dla określenia ogólnej liczebności bakterii zastosowano dodatek nystatyny do podłoża agarowego PCA, natomiast do określenia ogólnej liczebności grzybów zastosowano dodatek tetracykliny. Stężenie wymienionych antybiotyków wynosiło 200 µl/200 ml upłynnionej pożywki agarowej PCA. Dla roztworów glebowych przygotowanych do oznaczania liczebności mikroorganizmów oznaczano potencjał redoks za pomocą pH-metru wyposażonego w elektrodę do pomiaru potencjału redoks.

Wyniki oznaczeń zawarto w Tabeli 3.

Tabela 3

L.p.	Mierzony parametr	Przed implementacją	Czas od implementacji	
			7 dni	28 dni
1.	Ogólna liczebność mikroorganizmów	$4,0 \times 10^6$ (jtk/ml)	$4,5 \times 10^6$ (jtk/ml)	$3,9 \times 10^7$ (jtk/ml)
2.	Ogólna liczebność bakterii	$2,1 \times 10^6$ (jtk/ml)	$2,8 \times 10^6$ (jtk/ml)	$3,0 \times 10^7$ (jtk/ml)
3.	Ogólna liczebność grzybów	$3,0 \times 10^3$ (jtk/ml)	$3,2 \times 10^3$ (jtk/ml)	$5,5 \times 10^3$ (jtk/ml)
4.	Potencjał redoks	276 mV	290 mV	334 mV

Badania prowadzono w temperaturze otoczenia 15–26°C i wilgotności gleby > 27%.

Korzystnymi skutkami zastosowania biokompozytu w połączeniu z liofilizatami do implementacji w glebie jest zwiększenie ogólnej liczebności mikroorganizmów (OLD) w glebie po 4 tygodniach o ponad 30%, ogólnej liczebności bakterii o ponad 20% i ogólnej liczebności grzybów o ponad 6%, a także zwiększenie potencjału redoks o około 15% w porównaniu do wartości sprzed wprowadzenia biokompozytu do gleby. Korzystny efekt wzrostu liczebności bakterii w glebie obserwuje się po 48 godzinach od wprowadzenia produktu do gleby, natomiast wzrost liczebności i grzybów w glebie oraz wzrostu potencjału redoks gleby zauważa się po 7 dniach od implementacji.

Po 4 tygodniach od implementacji przy zachowaniu wilgotności od 25% do 90% zebrano glebę do głębokości 30 cm z obszaru 3 m² i przesiano przez sita o kolejnej wielkości oczek 10 mm, 5 mm i 2 mm. Po przesianiu nie stwierdzono na sicie śladów biokompozytu, tak więc nośnik ulega całkowitemu rozkładowi i niemożliwe jest jego odseparowanie z gleby po przesianiu podłoża na sicie o wielkości oczek > 2 mm.

Literatura:

- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2007). Isolation and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading bacteria and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Bacillus* sp. AF3. *International biodeterioration & biodegradation*, 60(2), 109–115.
- Bajer, K., Richert, A., Bajer, D., & Korol, J. (2012). Biodegradation of plastified starch obtained by corotation twin-screw extrusion. *Polymer Engineering & Science*, 52(12), 2537–2542.
- Janczak, K., Dąbrowska, G. B., Raszewska-Kaczor, A., Kaczor, D., Hryniewicz, K., & Richert, A. (2020). Biodegradation of the plastics PLA and PET in cultivated soil with the participation of microorganisms and plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 155, 105087.
- Martyniuk, S. (2012). Factors affecting the use of microbial biopesticides in plant protection. Czynniki wpływające na wykorzystanie biopesticydów mikrobiologicznych w ochronie roślin. *Progress in Plant Protection*, 52(4), 957–962.

Zastrzeżenia patentowe

1. Biokompozyt do poprawy jakości biologicznej gleby **znamienny tym**, że zawiera co najmniej 36 części wagowych skrobi ziemniaczanej lub kukurydzianej albo pszennej, od 15 do 25 części wagowych gliceryny, od 10 do 20 części wagowych oleju palmowego, od 10 do 14 części wagowych mocznika, od 2 do 5 części wagowych mączki wapiennej oraz liofilizat szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* w ilości od 0,001 do 0,010 części wagowych liofilizatu na 100 części wagowych granulowanego biokompozytu.
2. Sposób otrzymywania biokompozytu do poprawy jakości biologicznej gleby **znamienny tym**, że do co najmniej 36 części wagowych skrobi ziemniaczanej lub kukurydzianej albo pszennej wprowadza się: od 15 do 25 części wagowych gliceryny, od 10 do 20 części wagowych oleju palmowego, od 10 do 14 części wagowych mocznika, od 2 do 5 części wagowych mączki wapiennej miesza się, po czym w znany sposób wytłacza się w zakresie temperatur 50°C do 90°C, kolejno granuluje się, następnie biokompozyt w formie granulatu miesza się z liofilizatami szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* w ilości od 0,001 do 0,010 części wagowych liofilizatu na 100 części wagowych granulowanego biokompozytu, po czym tak otrzymany biokompozyt z liofilizatami niezwłocznie umieszcza się w szczelnym opakowaniu.
3. Sposób otrzymywania biokompozytu według zastrz. 1 **znamienny tym**, że sporządza się zawiesiny każdego ze szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* w sterylnej soli fizjologicznej o mętności roztworu 2,0 McF, co odpowiada teoretycznej gęstości optycznej 550 nm wynoszącej 0,5 i liczebności około 600×10^6 jtk/ml, które to zawiesiny w warunkach sterylnych nanosi się na powierzchnię zestaloną pełnowartościową pożywkę agarową, którą rozprowadza się równomiernie po powierzchni agaru i inkubuje się w czasie 24–48 godzin w temperaturze 23–29°C aż do momentu co najmniej 50% porośnięcia powierzchni pożywki agarowej, z kolei po inkubacji wyrosłe kolonie szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus* zebrane z powierzchni agarowej pożywki liofilizuje się w formie kultury mieszanej w czasie od 4 godzin do 12 godzin w próżni 0,5 mbar i temperaturze od –40 do –80°C uzyskując przeżywalność bakterii wynoszącą przynajmniej $2,0 \times 10^5$ jtk na 1 mg liofilizatu.
4. Zastosowanie biokompozytu do poprawy jakości biologicznej gleby określonego w zastrz. 1 polega na implementacji w glebie, tak wytworzonego granulowanego biokompozytu z liofilizatami szczepów bakterii mezofilnych *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus cereus*.