

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 246324 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443640**

(22) Data zgłoszenia: **2023.01.31**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.08.05 BUP 32/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.01.07 WUP 01/2025**

(51) MKP:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/11** (2006.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

**A01N 63/22** (2020.01)

(73) Uprawniony z patentu:  
**UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH,  
Katowice, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:  
**DARIA CHLEBEK, Brzeźce, PL**  
**BOŻENA NOWAK, Katowice, PL**  
**DANUTA WOJCIESZYŃSKA, Orzesze, PL**  
**KATARZYNA HUPERT-KOCUREK,  
Bieruń Stary, PL**

(74) Pełnomocnik:  
**rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka, Kraków, PL**

(54) Tytuł:

**Endofityczny szczep bakterii Priestia megaterium oraz jego zastosowania**

**PL 246324 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest endofityczny szczep bakterii *Priestia megaterium* oraz jego działanie przeciwgrzybowe oraz zastosowanie w promowaniu wzrostu i ochronie rzepaku przed patogenami grzybowymi.

Patogeny grzybowe odpowiadają za szereg chorób roślin, przez co stanowią poważne zagrożenie dla rolnictwa i przemysłu opartego na produktach roślinnych. Do zwalczania takich fitopatogenów grzybowych powszechnie stosuje się środki chemiczne. Mikroorganizmy wykazujące oddziaływanie antagonistyczne wobec fitopatogenów stanowią alternatywę pozwalającą na ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin. Taką rolę mogą pełnić bakterie endofityczne zasiedlające wewnętrzne tkanki roślin. Obecność tych bakterii w roślinie zapewnia stałą ochronę przed patogenami, a dodatkowo wpływa pozytywnie na wzrost, rozwój i kondycję rośliny.

Obecnie, na polskim rynku, wśród zarejestrowanych dla rzepaku biologicznych środków ochrony roślin możemy znaleźć jedynie dwa preparaty grzybowe: Contans WG zawierający w swoim składzie grzyba *Coniothyrium minitans* oraz Polygreen Fungicide WP zawierający grzyba *Pythium oligandrum* oraz sześć fungicydów bakteryjnych zawierające szczepy bakterii *Bacillus amyloliquefaciens*.

Celem wynalazku było uzyskanie nowego szczepu bakterii zdolnego do wnikania z gleby do rośliny i przeżywania w roślinie (szczepu endofitycznego), promującego wzrost roślin oraz wykazującego aktywność biologiczną, pozwalającą na zastosowanie szczepu jako szczepionki lub składnika szczepionki o działaniu ochronnym (przeciwgrzybowym) zwłaszcza w uprawie rzepaku. Stała obecność szczepu w komórkach rośliny zapewni ciągłą ochronę przed patogenami.

Istotą wynalazku jest nowy endofityczny szczep bakterii *Priestia megaterium*, oznaczony symbolem KW16 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod nr B/00441. Depozyt złożono w dniu 07.10.2022 r.

Istotą wynalazku jest także zastosowanie endofitycznego szczepu *Priestia megaterium* KW16 jako szczepionki lub składnika szczepionki mikrobiologicznej o aktywności przeciwgrzybowej wobec grzybowych fitopatogenów wybranych z grupy: *Colletotrichum dematium*, *Fusarium avenaceum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Kolejną istotą wynalazku jest zastosowanie endofitycznego szczepu bakterii *Priestia megaterium* KW16 jako szczepionki lub składnika szczepionki stosowanej w promowaniu wzrostu rzepaku oraz w ochronie rzepaku przed *Rhizoctonia solani* lub *Sclerotinia sclerotiorum*.

Zgodnie z założonym celem wynalazku nowy szczep bakterii hamuje wzrost i rozwój grzybowych patogenów roślin: *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium avenaceum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Aktywność antagonistyczną nowego szczepu bakterii określano w testach podwójnej hodowli.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym:

Fig. 1 – zahamowanie wzrostu wszystkich badanych grzybów tj. *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium avenaceum* i *Sclerotinia sclerotiorum* przez szczep KW16

Fig. 2 – hamujący wpływ lotnych metabolitów produkowanych przez szczep KW16 na wzrost wszystkich badanych grzybów tj. *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium avenaceum* i *Sclerotinia sclerotiorum*

Fig. 3 – hamowanie wzrostu grzyba *Rhizoctonia solani* przez szczep bakterii KW16

Fig. 4 – hamowanie wzrostu grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* przez szczep bakterii KW16

Fig. 5 – liczba bakterii KW16 zasiedlających rzepak w kolejnych dniach eksperymentu

Fig. 6 – promocja wzrostu rzepaku w obecności bakterii KW16

Fig. 7 – wpływ bakterii KW16 na przyrost długości oraz masy pędów i korzeni rzepaku w obecności grzyba *Rhizoctonia solani*

Fig. 8 – rzepak po 35 dniach wzrostu w doniczkach w obecności grzyba *Rhizoctonia solani*; zdjęcie z lewej strony – hodowla prowadzona w obecności samego grzyba, zdjęcie z prawej strony – hodowla prowadzona w obecności grzyba *Rhizoctonia solani* i szczepu bakterii KW16

Fig. 9 – wpływ bakterii KW16 na przyrost długości oraz masy pędów i korzeni rzepaku w obecności grzyba *Sclerotinia sclerotiorum*

Fig. 10 – rzepak po 35 dniach wzrostu w doniczkach w obecności grzyba *Sclerotinia sclerotiorum*; zdjęcie z lewej strony – hodowla prowadzona w obecności samego grzyba, zdjęcie z prawej strony – hodowla prowadzona w obecności grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* i szczepu bakterii KW16.

### Przykład 1. Cechy morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne.

Szczep *Priestia megaterium* oznaczony jako KW16 wyizolowano jako dominujący z tkanki korzeniowej wiechliny łąkowej (*Poa pratensis* L.). Korzenie trawy dokładnie oczyszczano z ziemi i sterylizowano powierzchniowo. Sterylne próby homogenizowano przez rozcieranie w moździerzach w 9 ml sterylnej soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Z otrzymanego maceratu przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych. Z przygotowanych rozcieńczeń wysiewano po 0,1 ml na płytki ze stałym podłożem LB. Macerat rozprowadzano głaszczką po powierzchni podłoży, po czym płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godzin w warunkach tlenowych.

Wyizolowany nowy szczep KW16 charakteryzuje się następującymi cechami:

- cechy morfologiczne: na stałej pożywce LB szczep tworzy matowe kolonie o nieregularnym kształcie. Kolonie przybierają mleczną barwę. W obrazie mikroskopowym bakterie mają postać laseczek układających się pojedynczo lub tworzących łańcuszki. Są GRAM (+), katalazo-dodatnie, ruchliwe, wytwarzają spory.
- cechy fizjologiczne i biochemiczne: szczep wykazuje zdolność do wzrostu w temperaturze 20-45°C; pH 4,0-9,0; toleruje zasolenie do 6% oraz obecność jonów metali ciężkich: Zn<sup>2+</sup> (do 8 mM), Cu<sup>2+</sup> (do 4 mM), Cd<sup>2+</sup> (do 0.1 mM), Ni<sup>2+</sup> (do 0,25 mM). Jako źródło węgla szczep KW16 wykorzystuje: glukozę, arabinozę, ramnozę, mannozę, trehalozę, kwas bursztynowy, cytrynowy i benzoosowy oraz fenol. U szczepu KW16 wykazano również zdolność do produkcji czynników promujących wzrost i rozwój roślin, takich jak: kwas indolilo-3-octowy (IAA), kwas salicylowy, amoniak, deaminaza ACC oraz do mobilizacji fosforanów.

W celu ustalenia przynależności gatunkowej nowego szczepu KW16 przeprowadzono amplifikację i sekwencjonowanie genu 16S rDNA z wykorzystaniem specyficznych starterów 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') i 1492R (5'GGTTACCTTGTACGACTT3'). Ostatecznie przynależność taksonomiczna szczepu KW16 do gatunku *Priestia megaterium* została poparta sekwencjonowaniem genomowym (NCBI Reference Sequence: NZ\_JAHTKR000000000).

### Przykład 2. Aktywność antagonistyczna.

W pierwszym teście hodowle prowadzono na szalkach z podłożem PDA. 1 cm od brzegu płytki umieszczano 5 mm krążek grzybni, a następnie, w odległości 3 cm posiewano bakterie. Jako kontrole stosowano szalki z podłożem PDA zaszczerpione tylko grzybami: *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium avenaceum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Płytki inkubowano w temperaturze 28°C przez 7-10 dni. Po inkubacji mierzono odległość pomiędzy miejscem inokulacji krążka grzybowego a aktywnie rosnącymi brzegami grzyba zarówno na płytkach kontrolnych, jak i tych, które zostały zaszczerpione dodatkowo bakteriami. Procent zahamowania wzrostu (PGI) obliczano korzystając z równania:  $PGI (\%) = KR - R1 / KR * 100\%$ , gdzie KR – odległość (w mm) od miejsca zaszczerpienia grzyba do krawędzi grzybni, R1 – odległość (w mm) od miejsca zaszczerpienia grzyba do krawędzi grzybni na płytkach zaszczerpionych bakteriami.

Wykazano, że szczep *Priestia megaterium* KW16 hamował wzrost wszystkich badanych patogenów od 6-40%. Największy procent aktywności fungistatycznej szczepu KW16 obserwowano wobec *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum dematium* i *Fusarium avenaceum* (Fig. 1).

W celu zbadania zdolności szczepu z rodzaju *Priestia megaterium* do produkcji lotnych metabolitów o aktywności przeciwgrzybowej prowadzono hodowle na dwudzielnych szalkach Petriego. Zawiesinę bakterii rozprowadzano na jednej połowie szalki zawierającej podłoże LB, na drugiej połowie szalki, zawierającej podłoże PDA, umieszczano 5 mm krążek grzybni danego patogenu i szczelnie zamykano. Płytki inkubowano w temperaturze 28°C przez 7-10 dni. Po inkubacji mierzono odległość pomiędzy miejscem inokulacji krążka grzybowego a aktywnie rosnącymi brzegami grzyba zarówno na płytkach kontrolnych, jak i tych, które zostały zaszczerpione dodatkowo bakteriami. Procent zahamowania wzrostu (PGI) obliczano korzystając z równania:  $PGI (\%) = KR - R1 / KR * 100\%$ , gdzie KR – odległość (w mm) od miejsca zaszczerpienia grzyba do krawędzi grzybni, R1 – odległość (w mm) od miejsca zaszczerpienia grzyba do krawędzi grzybni na płytkach zaszczerpionych bakteriami.

Wykazano zdolność szczepu *Priestia megaterium* KW16 do produkcji lotnych metabolitów o aktywności przeciwgrzybowej. Największy procent zahamowania wzrostu grzybów od 40-60% obserwowano odpowiednio dla *Sclerotinia sclerotiorum* i *Rhizoctonia solani* (Fig. 2, 3 i 4).

### Przykład 3. Zdolność szczepu *Priestia megaterium* KW16 do kolonizacji i przeżywalności w rzepaku.

Aby umożliwić śledzenie obecności i tym samym przeżywalności bakterii w tkankach roślinnych, przygotowano mutanty ryfampicynowe szczepu KW16. Następnie do gleby wprowadzono nasiona rzepaku i 50 ml roztworu tak przygotowanych bakterii w liczbie około  $10^9$  j.t.k./ml, zawieszonych w podłożu LB.

Celem izolacji bakterii z roślin, po 7, 14, 28 i 35 dniach hodowli pędy i korzenie roślin sterylizowano powierzchniowo. Sterylne próby homogenizowano przez rozcieranie w moździerzach, w 9 ml sterylnej soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Z otrzymanego maceratu przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych. Z przygotowanych rozcieńczeń pobierano po 20  $\mu$ l i nakrapiano na płytki ze stałym podłożem LB z dodatkiem ryfampicyny (150  $\mu$ g/ml) po czym płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 godziny w warunkach tlenowych.

Stwierdzono, że po inokulacji do gleby, wraz z czasem prowadzenia hodowli zwiększała się liczba bakterii w roślinach osiągając, w 35 dniu badań, 2,09 log j.t.k. g<sup>-1</sup> ś. m. rośliny (Fig. 5).

Podsumowując, szczep KW16 wykazuje zdolność przechodzenia z gleby i trwałej kolonizacji wewnętrznych tkanek rzepaku.

### Przykład 4. Zdolność szczepu *Priestia megaterium* KW16 do wspomagania wzrostu rzepaku.

Dla oceny zdolności mikroorganizmów do wspomagania wzrostu rzepaku, glebę zaszczipiano badanym szczepem bakterii w liczbie około  $5 \times 10^{10}$  j.t.k. zawieszonych w podłożu LB. Do tak przygotowanej gleby wysiewano nasiona rzepaku. Kontrolę stanowiła gleba niezaszczepiona KW16.

Obecność badanych bakterii w glebie wpływała znacząco na wzrost wykiełkowanych roślin (Fig. 6). Przyrost długości i masy pędów wynosił około 25% i 132%, a długości i masy korzeni, odpowiednio pomiędzy 73% i 419% w stosunku do roślin niezaszczepionych.

Szczep *Priestia megaterium* KW16 wpływa znacząco na wzrost i rozwój rzepaku, szczególnie na wzrost masy korzeniowej co może przełożyć się na zwiększoną odporność rośliny na niekorzystne warunki środowiska, w tym obecność patogenów.

### Przykład 5. Zdolność szczepu *Priestia megaterium* KW16 do ochrony rzepaku przed patogenami grzybowymi *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum*.

Dla oceny zdolności badanych bakterii do niwelowania skutków obecności patogenów grzybowych, glebę do doświadczeń skażano grzybnią *Rhizoctonia solani* lub *Sclerotinia sclerotiorum*, a następnie zaszczipiano badanym szczepem bakterii. Do tak przygotowanej gleby wysiewano nasiona rzepaku. Kontrolę stanowiła gleba niezaszczepiona KW16.

Stwierdzono, że w układach z *Rhizoctonia solani* (Fig. 7 i 8) wprowadzenie bakterii, powodowało zwiększenie długości pędów roślin o około 28%, a masy pędów o około 215% w odniesieniu do układów z samym grzybem. W obecności szczepu KW16 zaobserwowano również przyrost długości, jak i masy korzenia o odpowiednio 3% oraz 370%. Pomimo obecności grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* (Fig. 9 i 10), u wszystkich roślin wzrastających w glebie zaszczipionej grzybem oraz szczepem KW16, wykazano znaczący przyrost zarówno długości, jak i masy pędów i korzeni w stosunku do układów kontrolnych bez bakterii. Długość pędów zwiększała się o 11%, a ich masa o 193%, podczas gdy długość i masa korzeni zwiększała się odpowiednio o 76% i 662%.

Podsumowując, obecność bakterii znosiła negatywny wpływ patogenów grzybowych na wzrost rzepaku.

## **Zastrzeżenia patentowe**

1. Endofityczny szczep bakterii *Priestia megaterium* KW16 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod nr B/00441.
2. Zastosowanie endofitycznego szczepu bakterii *Priestia megaterium* KW16 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod nr B/00441 jako szczepionki lub składnika szczepionki mikrobiologicznej o aktywności przeciwgrzybowej wobec grzybowych fitopatogenów wybranych z grupy: *Colletotrichum dematium*, *Fusarium avenaceum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

3. Zastosowanie endofitycznego szczepu bakterii *Priestia megaterium* KW16 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod nr B/00441 jako szczepionki lub składnika szczepionki stosowanej w promowaniu wzrostu rzepaku.
4. Zastosowanie endofitycznego szczepu bakterii *Priestia megaterium* KW16 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod nr B/00441 jako szczepionki lub składnika szczepionki stosowanej w ochronie rzepaku przed *Rhizoctonia solani* lub *Sclerotinia sclerotiorum*.

## Rysunki

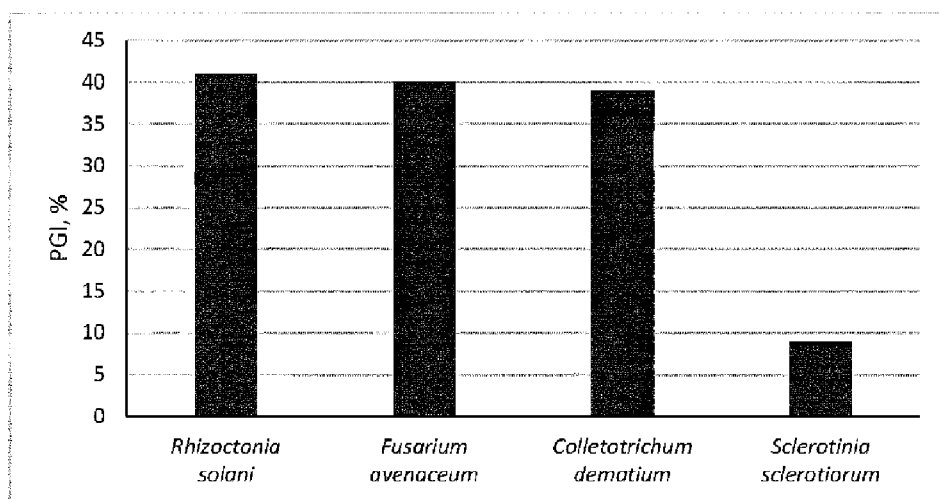


Fig. 1

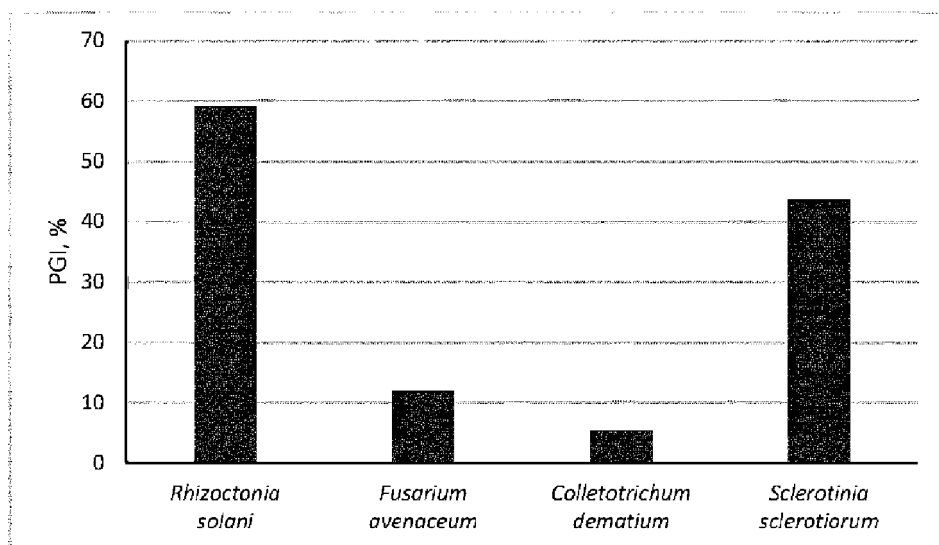


Fig. 2.

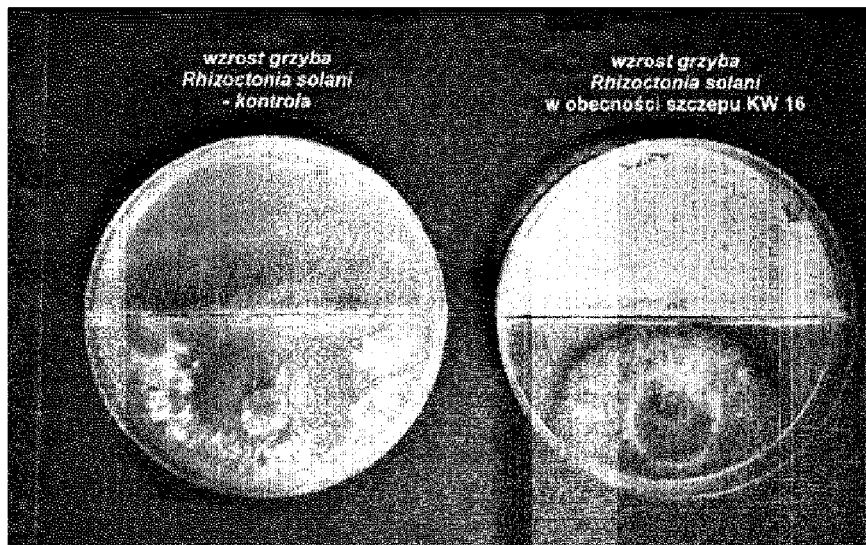


Fig. 3.

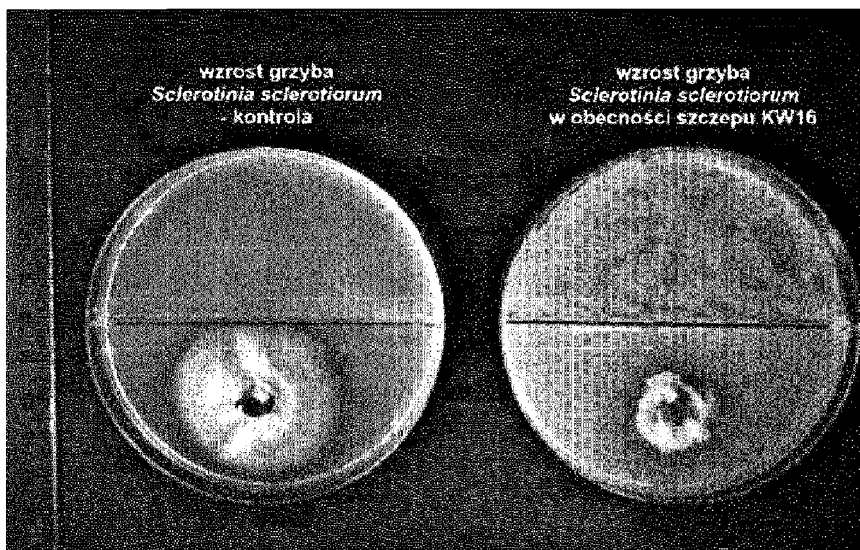


Fig. 4

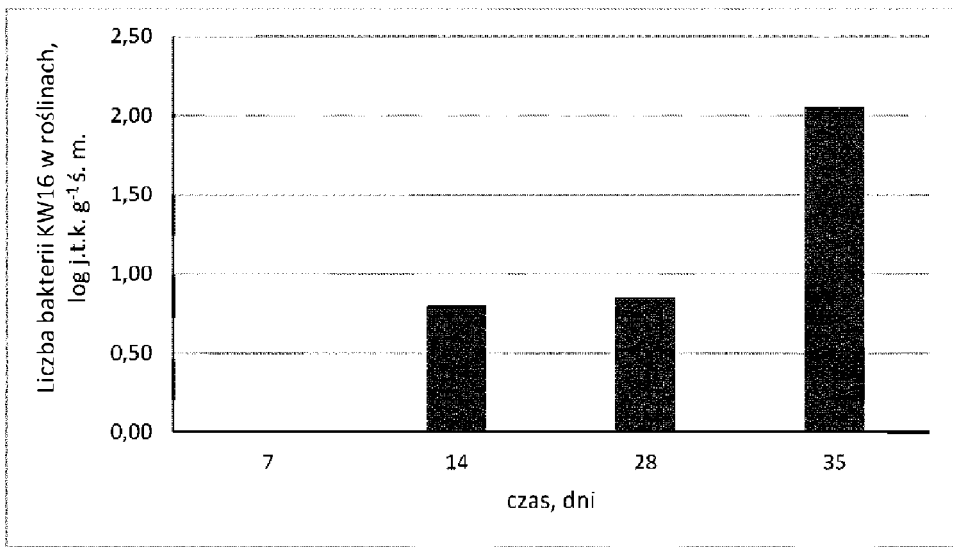


Fig. 5

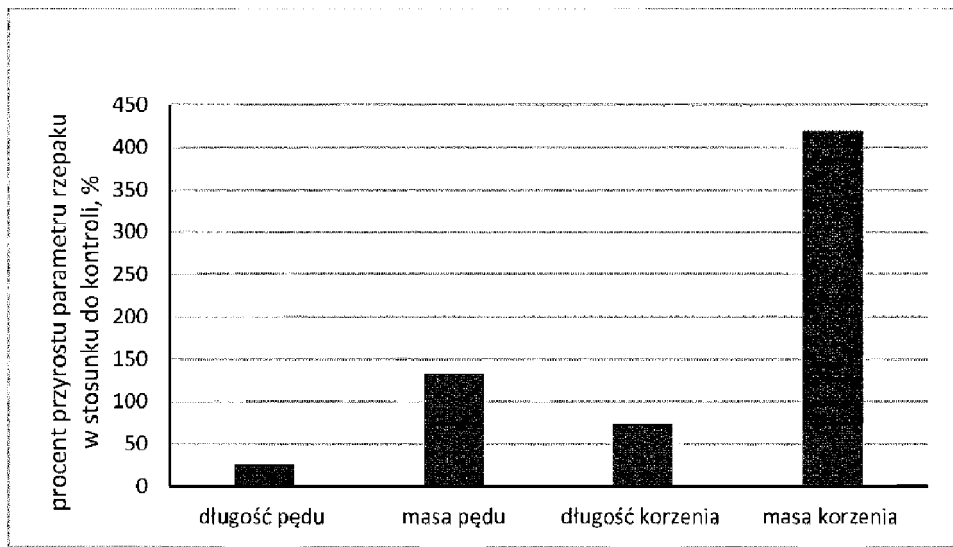


Fig. 6

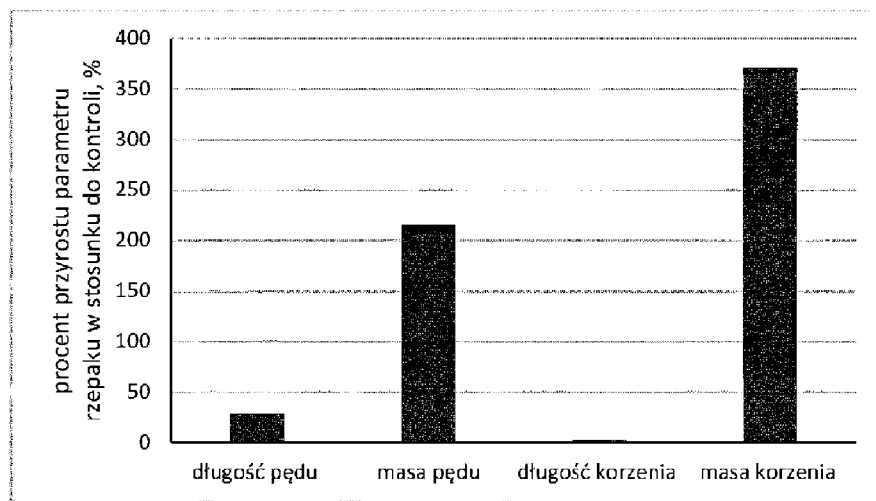


Fig. 7

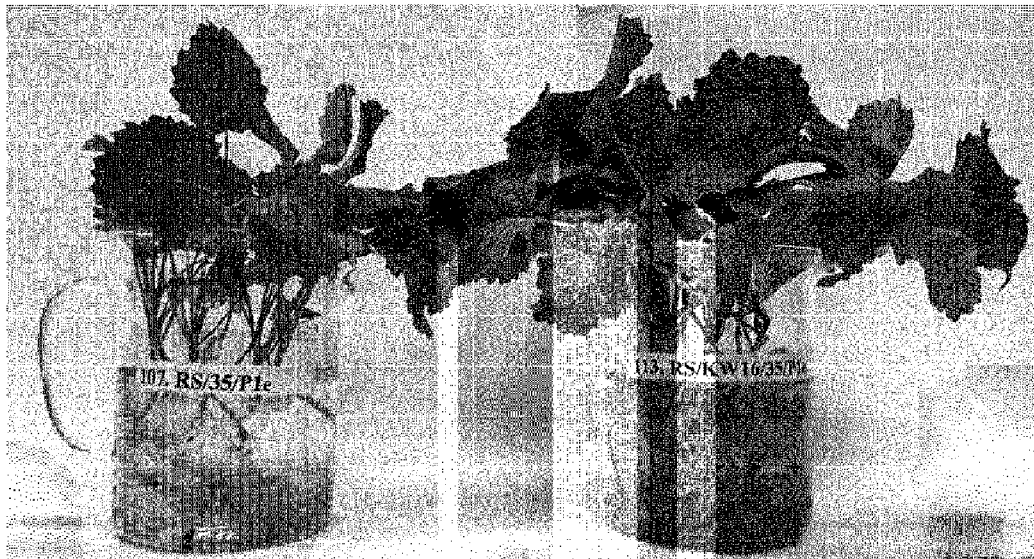


Fig. 8

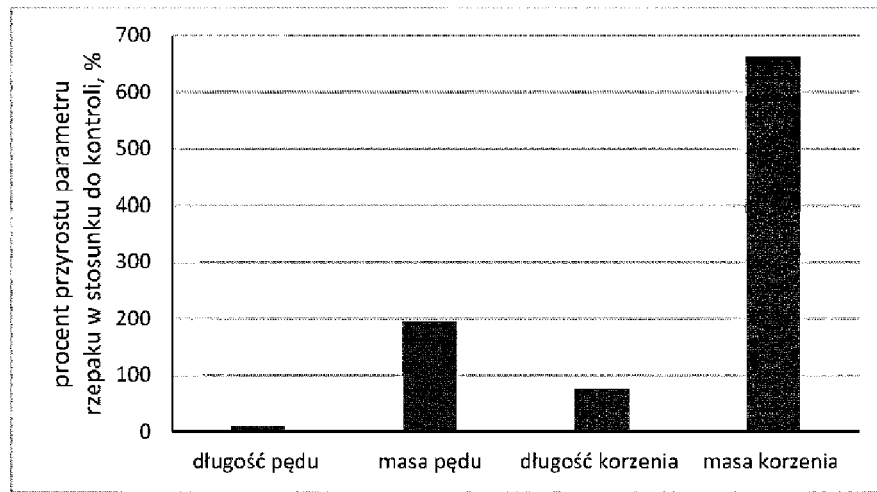


Fig. 9

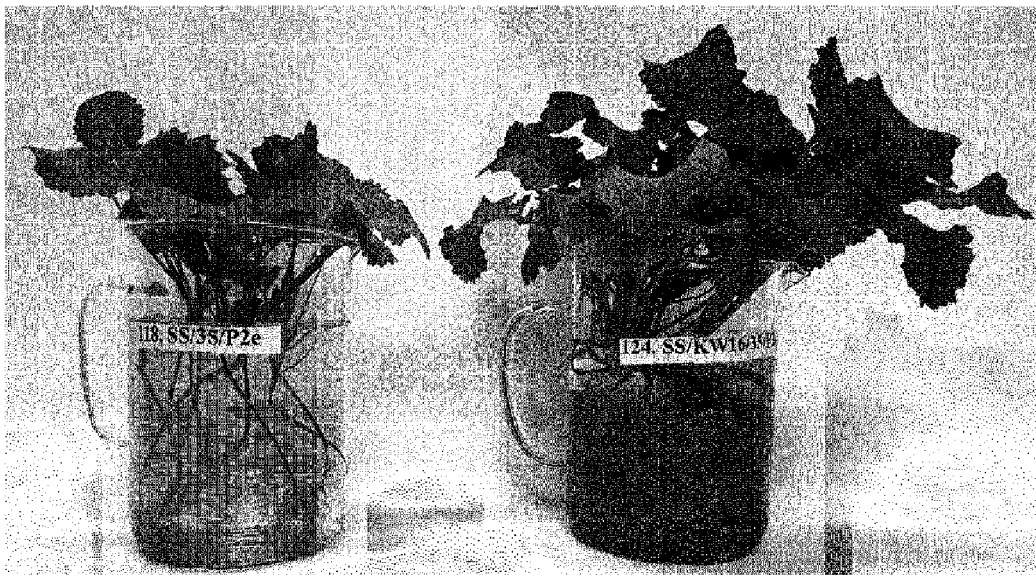


Fig. 10