

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244109 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439141**

(22) Data zgłoszenia: **2021.10.04**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.11 BUP 15/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.12.04 WUP 49/2023**

(51) MKP:

A01N 63/22 (2020.01)

A01P 21/00 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**KATOLICKI UNIWERSYTET LUBELSKI
JANA PAWŁA II, Lublin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**AGNIESZKA KUŹNIAR, Lublin, PL
AGNIESZKA WOLIŃSKA, Lublin, PL
KINGA WŁODARCZYK, Panieńszczyzna, PL
WERONIKA GORAJ, Sandomierz, PL**

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania biopreparatu wspomagającego wzrost i rozwój pszenicy ozimej zawierającego szczepy endofityczne

PL 244109 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania biopreparatu zawierającego szczepy endofityczne do wspomagania wzrostu i rozwoju pszenicy ozimej w początkowych fazach jej wzrostu.

W ostatnim dziesięcioleciu XX wieku obserwowaliśmy ogromny rozwój chemizacji rolnictwa. Najnowsze badania dotyczące środowiska glebowego wskazują, iż intensyfikacja stosowania środków ochrony roślin, a także nawozów sztucznych doprowadza do zaburzenia równowagi mikrobiologicznej gleby. Obecnie misją rolnictwa jest stosowanie integrowanej ochrony roślin, która skupia się na starannym rozważeniu wszystkich dostępnych metod ich ochrony. Kolejnym krokiem winno być zaś przedsięwzięcie właściwych środków mających na celu zahamowanie rozwoju populacji organizmów szkodliwych oraz stosowanie form interwencji na ekonomicznie i ekologicznie uzasadnionym poziomie, a także finalnie zmniejszenie lub zminimalizowanie zagrożenia wobec zdrowia ludzi i środowiska (red. Praczyk, 2015). Jednym z głównych celów integrowanej ochrony roślin jest wykorzystywanie preparatów mikrobiologicznych.

W integrowanej uprawie roślin istotną rolę odgrywa nawożenie oraz ochrona biologiczna. Działanie biopreparatów koncentruje się zwykle na ograniczaniu rozwoju patogenów i szkodników (biologiczna ochrona), a także na stymulowaniu wzrostu i plonowania niektórych roślin uprawnych (Matyjniuk, 2011). Podkreślić trzeba też fakt, że skuteczność preparatów biologicznych jest niewątpliwie mniejsza niż stosowanych środków chemicznych. Dotyczy to zwłaszcza biopreparatów opartych na mikroorganizmach (bakteriach i grzybach), które aplikowane są do gleby, czyli do środowiska charakteryzującego się bardzo dużą złożonością różnego rodzaju oddziaływań, w tym antagonistycznych oraz ogromną konkurencyjnością o energię i składniki odżywcze pomiędzy drobnoustrojami glebowymi i innymi organizmami gleby (Martyniuk, 2011). Co więcej, gleba jest także środowiskiem o dużej zmienności czynników abiotycznych (wilgotność, temperatura, wartości pH, zabiegi agrotechniczne), które bardzo istotnie wpływają na przeżywalność i funkcje organizmów.

Impulsem do podjęcia badań nad konstrukcją biopreparatu dedykowanego pszenicy ozimej są mikroorganizmy endofityczne bytujące zarówno w ziarnie, jak i w roślinach. Obecnie na rynku zauważalny staje się brak preparatu stanowiącego konsorcjum zbudowane z izolatów endofitycznych. Endofity zasiedlają różne tkanki roślin, wykazując przy tym pewną zależność: na układ strukturalny i funkcjonalny mikrobiomu ma wpływ etap rozwoju rośliny i jej stan fizjologiczny. Mikrobiom endofityczny może wspierać zatem promowanie wzrostu roślin (Hoffman i wsp. 2013), bezpośrednio wpływać na zwiększenie ich produktywności, a także chronić je przed działaniem szkodliwych czynników (susza, brak dostępnego składnika odżywczego).

W literaturze zagranicznej istnieje patent nr US 2015/0335029 A1 odnośnie metody produkcji nasion zawierających mikroorganizmy endofityczne oraz patent nr WO2015/200902A8 dotyczący przedstawienia materiałów i metod poprawiania cech roślin i zapewniania korzyści roślinom.

Dotychczasowe badania dotyczyły wykorzystania mikroorganizmów wyizolowanych ze środowiska, natomiast nikt nie wykorzystał do tego celu konsorcjum bakterii wyizolowanego bezpośrednio z tkanek roślinnych.

Istota wynalazku polega na tym, że uzyskane niemodyfikowane genetycznie szczepy bakterii endofitycznych należące do rodzaju *Bacillus* namnaża się w bioreaktorze o pojemności roboczej 4 l, wykorzystując jako medium hodowlane bulion odżywczy, przez 24 h w temperaturze 28°C w warunkach tlenowych do gęstości optycznej mierzonej przy długości fali $\lambda = 600 - 2,5$, po czym zostają połączone z nośnikiem: biowęgiel jesion wytworzony w temperaturze 500°C w stosunku 10 g biowęglu na 1000 ml hodowli z wprowadzeniem do przygotowania biopreparatu glutaminianu monosodowego o stężeniu 1,5%, chroniącego komórki mikroorganizmów endofitycznych przed niekorzystnym działaniem czynników środowiskowych a jednocześnie zapewniającego źródło węgla i energii mikroorganizmom wchodzącym w skład konsorcjum.

Rys. 1. Liczebność komórek bakteryjnych w biopreparacie w trakcie przechowywania analizowana z błękitem trypanu w komorze Bürkera.

Sposób według wynalazku przedstawiono na poniższych przykładach.

Przykład I

Wyizolowane mikroorganizmy endofityczne z siewek pszenicy w stadium wzrostu 13 według skali BBCH scharakteryzowane pod względem genetycznym, których przynależność taksonomiczną ustalono do rodzaju *Bacillus* sp. (Tab. 1) namnażano w bioreaktorze o pojemności roboczej 4 l, wykorzystując jako medium hodowlane bulion odżywczy (skład w g/L: ekstrakt mięsny, ekstrakt drożdżowy, pepton,

chlorek sodu, glukoza). 23 g podłoża zawieszono w 1000 ml wody destylowanej (pH $7,5 \pm 0,1$; sterylizacja 121°C 15 min) przez 24 h w temperaturze 28°C w warunkach tlenowych (gęstość optyczna OD_{600} wynosiła 2,5, liczba komórek bakteryjnych). Następnie namnożone mikroorganizmy endofityczne połączono z nośnikiem: biowęgiel jesion wytworzony w temperaturze 500°C w stosunku 10 g biowęglu na 1000 ml hodowli. Do przygotowania biopreparatu wykorzystano dodatek substancji, która będzie chroniła komórki mikroorganizmów endofitycznych przed niekorzystnym działaniem czynników środowiskowych (np. zmiana ciśnienia osmotycznego, temperatura), a jednocześnie będzie zapewniała źródło węgla i energii mikroorganizmom wchodzącym w skład konsorcjum – z punktu widzenia ekonomicznego zastosowano w tej roli glutaminian monosodowy (1,5%, liczba komórek bakteryjnych przygotowanego biopreparatu $8,96 \cdot 10^7$).

Tabela 1
Kompozycja szczepów biopreparatu

Taksonomia - Rodzaj	Numer w bazie szczepów wytypowanych do projektu	ID kolekcji	GenBank Accession number
<i>Bacillus sp.</i>	1	HLA 1-7	MT181071
	5	HLA 2-5	MT181075
	7	HLA 2-7	MT181077
	12	HLB 2-8	MT181082
	18	HLC 7	MT734565
	20	HLC 9	MT181095
	24	K2-12	MT181091
	45	KC 1-2	MT181111
	81	TLA 2-11	MT181156
	90	TPA 1-2	MT181165
	101	TPC 1-2	MT181175

Przykład II

W kolejnym kroku wykonano badanie trwałości biopreparatu. Analizę wpływu czasu i temperatury przechowywania badano z wykorzystaniem następujących oznaczeń: barwienia preparatem Live/Dead w połączeniu z obserwacją w mikroskopie fluorescencyjnym oraz liczebności komórek żywych z błękitem trypanu w komorze Bürkera. Analiza statystyczna wykazała, że temperatura (MANOVA, $p = 0,0001$) oraz czas (MANOVA, $p = 0,0001$) mają istotny wpływ na przechowywanie biopreparatu z glutaminianem sodu biorąc pod uwagę procent wybarwionych komórek żywych i martwych. Biopreparat ze środkiem konserwującym jest stabilny przez 5 miesięcy w każdej temperaturze 4°C , 20°C , 30°C . Odnotowano, że biopreparat GS w temperaturze przechowywania 4°C jest stabilny przez 7 miesięcy (Tabela 2).

Tabela 2
Wyniki barwienia Live/Dead w trakcie przechowywania biopreparatu z glutaminianem sodu

Czas przechowywania (miesiąc)	Temperatura przechowywania ($^{\circ}\text{C}$)					
	4		20		30	
	% komórek żywych	% komórek martwych	% komórek żywych	% komórek martwych	% komórek żywych	% komórek martwych
1	98,00	2,00	95,00	5,00	95,00	5,00
2	98,67	1,33	95,00	5,00	95,00	5,00
3	95,00	5,00	100,00	0,00	98,33	1,67
4	100,00	0,00	95,33	4,67	94,67	5,33
5	98,00	2,00	95,00	5,00	94,00	6,00
6	94,00	6,00	90,67	9,33	88,67	11,33
7	95,00	5,00	85,00	15,00	83,00	33,33
8	88,33	11,67	82,33	17,67	82,67	17,33

W 6 i 7 miesiącu pojawia się nieco więcej martwych komórek (do 33%) w stosunku do pierwszych 5 miesięcy przechowywania. Co ciekawe w 8 miesiącu wartości komórek martwych uległy zmniejszeniu, stąd też podjęto decyzję o przedłużeniu tego zadania i wykonywaniu analiz przechowywania przez kolejne 3 miesiące w kombinacji ze środkiem konserwującym oraz bez jego użycia. **Wykazano statystycznie istotny wpływ stosowania glutaminianu monosodowego na żywotność komórek biopreparatu (MANOVA, $p = 0,00001$).**

Liczebność żywych komórek bakteryjnych analizowana w komórce Bürkera była statystycznie istotna w zależności od czasu przechowywania biopreparatu GS oraz temperatury (Mannova, $p = 0,0001$). Do 4 miesiąca przechowywania biopreparatu ze środkiem konserwującym ilość bakteryjnych komórek pozostawała na poziomie od $1,09 \cdot 10^6$ do $1,38 \cdot 10^6$ komórek w 1 ml (Rys. 1). W 5–8 miesiącu następował spadek liczby żywych komórek bakteryjnych nawet do poziomu $6,0 \cdot 10^4$. Odnotowano istotny statystycznie wpływ temperatury ($p = 0,000001$) oraz czasu przechowywania ($p = 0,00001$) na liczebność komórek bakteryjnych w biopreparacie.

Przykład III

Analiza działania biopreparatu *in vitro*

Działanie preparatu analizowano w warunkach *in vitro* w różnych temperaturach 5°C, 15°C, 20°C, 30°C w dwóch dawkach bioprep A (ilość komórek $1,07 \cdot 10^7$) oraz B (ilość komórek $6,67 \cdot 10^4$) oraz stosując nasiona następujących pszenic: *Triticum aestivum* L cv. Hodnia i Tytanika oraz *Triticum spelta* cv. Rokosz. W Tabeli 3 przedstawiono średnie wartości długości epikotyli i korzeni. Analiza wyników wykazała istotny wpływ dawki biopreparatu oraz wpływ temperatury i odmiany na długość korzeni oraz epikotyli (MANOVA – $P = 0,0001$).

Tabela 3
Podsumowanie średnich wartości długości epikotyli i korzeni (mm)
po działaniu biopreparatu *in vitro* w różnych temperaturach

	długość epikotyli (mm)												
	5			15			20			30			
	Hondia	Rokosz	Tytanika	Hondia	Rokosz	Tytanika	Hondia	Rokosz	Tytanika	Hondia	Rokosz	Tytanika	
kontrola	5,536	6,546	5,649	15,000	20,024	11,175	20,000	22,359	13,071	30,000	55,024	45,550	
Bprep A	5,897	4,848	4,647	6,414	11,982	10,900	25,595	28,897	22,436	16,308	22,842	21,421	
Bprep B	6,209	5,321	4,811	22,175	24,257	9,093	12,143	21,302	11,622	32,825	50,462	46,262	
	długość korzenia (mm)												
	kontrola	8,429	13,041	9,298	15,867	18,235	20,714	18,037	29,410	16,396	30,918	41,442	31,579
	Bprep A	10,326	9,679	8,472	19,634	28,673	17,764	15,851	25,269	14,958	28,677	41,189	29,780
	Bprep B	9,448	10,405	7,118	17,875	20,671	18,272	21,500	19,633	17,949	18,658	24,657	17,888

Analiza statystyczna wykonana z użyciem kompletu otrzymanych wyników nie wykazała statystycznie istotnego wpływu stosowania biopreparatu w dwóch zastosowanych dawkach biorąc pod uwagę długość epikotyli oraz korzeni w analizowanym zakresie temperatur. Jednak szczegółowa analiza statystyczna odnośnie długości epikotyli wykazała statystycznie istotny wpływ dawki Bprep B o liczebności komórek bakteryjnych $6,67 \cdot 10^4$ w temperaturze 15°C i 20°C w przypadku ziarników odmiany Hondia, Tytanika i Rokosz (MANNOVA, $p = 0,00002$). Obserwacja ta może być bardzo interesująca z punktu widzenia praktycznego zastosowania biopreparatu, gdyż temperatury 15°C i 20°C mogą być najbardziej prawdopodobnymi temperaturami występującymi w czasie pierwszych etapów wzrostu pszenicy ozimej. Szczegółowa analiza statystyczna odnośnie długości korzeni wykazała istotny wpływ również dawki Bioprep B w temperaturach 15°C i 20°C dla odmiany Rokosz, Hondia i Tytanika (MANNOVA, $p = 0,00001$). Co więcej, odnotowano statystycznie istotny wpływ dawki Bprep A tylko w odniesieniu do odmiany Rokosz we wszystkich badanych temperaturach (MANNOVA, $p = 0,00037$, Tabela 3).

Na podstawie badań *in vitro* działania biopreparatu ustalono, że najbardziej optymalną dawką biopreparatu jest ta o gęstości komórek $6,67 \cdot 10^4$ dla wszystkich badanych odmian w temperaturach 15°C i 20°C. Wobec odmiany Rokosz ustalono statystycznie istotny wpływ stosowania biopreparatu w przypadku zastosowania dawki o większej gęstości komórek $1,07 \cdot 10^7$.

Przykład IV

Analiza działania biopreparatu w roślinie

W materiale roślinnym – siewki pszenicy w różnym stadium wzrostu (5, 10, 15, 20, 30, 35, 40 dni) pobrane z doświadczenia wazonowego wyznaczono aktywność enzymatyczną POX (Peroxidase,

peroksydaza) i PAL (Phenylalanine Ammonia-Lyase, amoniakoliza fenylalaniny). Tabela przedstawia aktywność POX. Analizy enzymatyczne PAL wykonano według dostępnej literatury w tym temacie: Ballester i wsp., 2006; Smirnov i wsp., 2015, Medda i wsp., 2020, natomiast aktywność POX wyznaczono według procedur opisanych przez: Ballester i wsp., 2006, Debona i wsp., 2012; Shokat i wsp., 2020. Odnotowano statystyczne różnice w aktywności peroksydazy pomiędzy roślinami rosnącymi z dodatkiem biopreparatu a roślinami nieinokulowanymi (MANNOVA, $p = 0,0001$). Jednak aktywność enzymu nie wykazywała trwałości podczas całego doświadczenia. Enzym POX oprócz usuwania z komórek roślinnych nadtlenu wodoru może również odgrywać ważną rolę w obronie roślin przed patogenami poprzez udział w biosyntezie ligniny. Jego podwyższona aktywność w roślinach inokulowanych może świadczyć o tworzącej się ochronie np. przeciwko patogenom. Hong-xia i współpracownicy (2011) potwierdzili, że zmienna aktywność POX była istotniejsza dla odmian odpornych niż podatnych na zakażenie *Rhizoctonia cerealis*, które analizowali. Wyraźnie wyższe wartości aktywności enzymu POX u roślin inokulowanych biopreparatem w stosunku roślin kontrolnych odnotowano w 40 dniu doświadczenia wazonowego (Tab. 4). Trend ten wykazano dla roślin odmiany Hondia i Tytanika. W przypadku roślin odmiany Rokosz nie potwierdzono przedstawionej zależności.

Tabela 4
Aktywność peroksydazy POX w tkankach pszenicy podczas doświadczenia wazonowego

Próby badane	czas wzrostu siewki (dzień)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
	Absorbancja 470 nm							
WO_OH	0,085	0,036	2,184	0,6248	0,067	0,761	0,065	0,695
WBprep_H	0,032	0,008	0,739	0,641	0,630	0,048	0,022	1,506
Wbcarb_H	0,003	0,397	0,015	0,293	1,224	0,408	0,248	0,149
WO_OR	0,016	0,139	0,124	0,646	0,007	0,198	0,7396	0,899
Wbprep_R	0,027	0,02	0,618	0,672	0,326	0,073	0,01	0,387
Wbcarb_R	1,207	0,053	0,0295	1,298	0,283	0,187	0,291	0,023
WO_T	0,506	0,014	0,259	0,774	0,029	0,080	0,594	0,173
Wbprep_T	0,233	0,006	0,248	0,342	0,396	0,028	0,007	0,844
Wbcarb_T	0,099	0,584	0,0118	1,108	0,725	0,658	0,426	0,029

W tabeli nr 5 przedstawiono aktywność enzymu PAL w badanych roślinach. Aktywność PAL statystycznie istotnie zwiększyła się w roślinach po traktowaniu biopreparatem i utrzymywała na stosunkowo wysokim poziomie przez 30 dni trwania doświadczenia (Mannova, $p = 0,001$). Pod koniec trwania doświadczenia tylko w nielicznych przypadkach odnotowano wysoką aktywność enzymu PAL, przykładem mogą być rośliny odmiany Rokosz inokulowane biopreparatem, które również mogą być przykładem utrzymywania się wysokiej aktywności PAL przez cały okres trwania doświadczenia wazonowego tj. 40 dni (Tab. 5).

Tabela 5
Aktywność amoniako-liazy L-fenylalaniny (PAL)

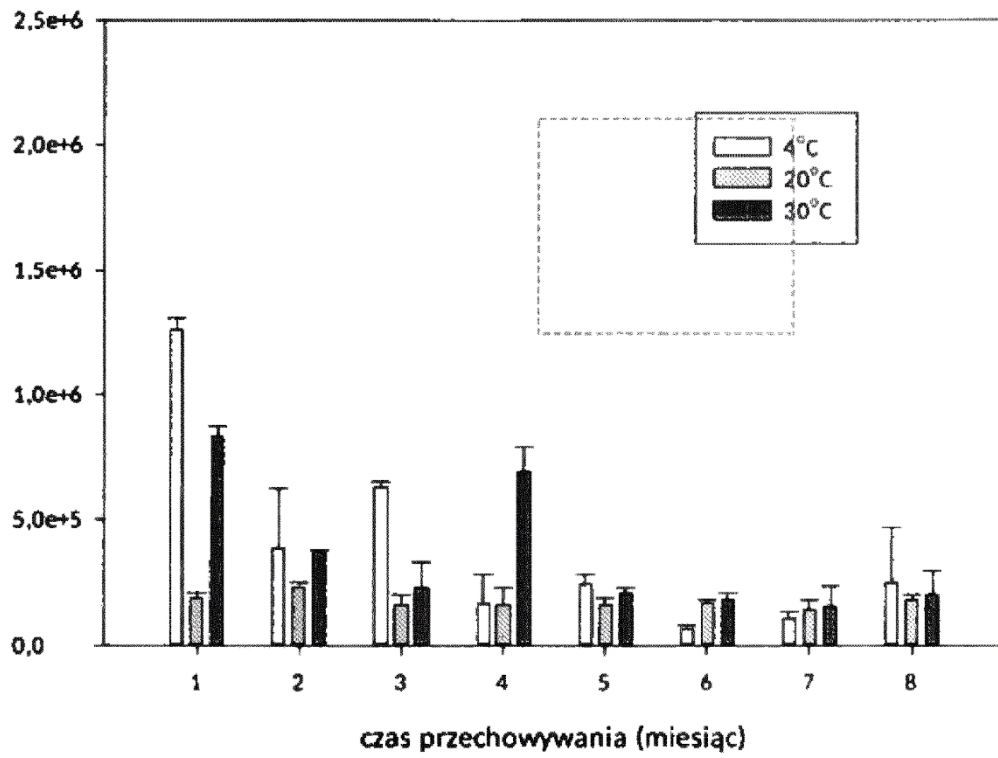
Próby badane	czas wzrostu siewki (dzień)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
Δ Absorbancja 470 nm								
WO_OH	0,718	1,688	1,207	2,023	1,203	2,996	0,802	2,797
WBprep_H	1,732	0,711	1,822	1,711	1,275	1,641	0,249	0,023
WBcarb_H	1,353	2,023	4,028	3,488	1,655	1,919	1,602	2,448
WO_OR	0,590	1,124	0,31867	1,271	0,64	0,592	0,928	0,175
WBprep_R	2,902	8,488	3,998	11,723	4,942	5,232	3,817	3,763
WBcarb_R	0,449	0,613	3,812	3,065	1,952	0,608	0,733	0,988
WO_T	1,723	3,259	2,141	5,827	4,145	4,003	5,139	4,771
WBprep_T	1,182	5,906	2,858	4,683	5,062	2,686	2,846	0,482
WBcarb_T	1,073	0,516	3,7	3,732	1,515	1,843	1,370	1,675

Możemy sądzić, że w związku ze zmienną aktywności PAL jak też POX działanie biopreparatu może być pomocne w zwiększeniu tolerancji lub odporności roślin na porażenie patogenem.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób otrzymywania preparatu endofitycznego, **znamienny tym**, że niemodyfikowane genetycznie uzyskane szczepy bakterii endofitycznych należące do rodzaju *Bacillus* namnażano w bioreaktorze o pojemności roboczej 4 l, wykorzystując jako medium hodowlane bulion odżywczy, przez 24 h w temperaturze 28°C w warunkach tlenowych do gęstości optycznej mierzonej przy długości fali $\lambda = 600 - 2,5$, po czym połączono je z nośnikiem: biowęgiel jesion wytworzony w temperaturze 500°C w stosunku 10 g biowęgla na 1000 ml hodowli wprowadzając do przygotowania biopreparatu glutaminian monosodowy o stężeniu 1,5%, chroniący komórki mikroorganizmów endofitycznych przed niekorzystnym działaniem czynników środowiskowych a jednocześnie zapewniający źródło węgla i energii mikroorganizmom wchodzącym w skład konsorcjum.

Rysunek



Rys. 1.