

Preparat mikrobiologiczny do mineralizacji materii organicznej zawierającej celulozę, zwłaszcza odpadów poźniwnych oraz zastosowanie preparatu mikrobiologicznego w uprawie roślin

Przedmiotem wynalazku jest preparat mikrobiologiczny zawierający żywe mikroorganizmy lub mikroorganizmy zdolne do rozmnażania się w glebach, przeznaczony do mineralizacji materii organicznej zawierającej zwłaszcza celulozę, zwłaszcza odpadów poźniwnych oraz zastosowanie preparatu mikrobiologicznego zawierającego żywe mikroorganizmy lub mikroorganizmy zdolne do rozmnażania się w glebach w uprawach rolniczych i ogrodnich.

Niniejszy wynalazek jest rozwiązaniem z dziedziny preparatów mikrobiologicznych zawierających nowe szczepy bakterii, przeznaczonych do intensyfikacji produkcji rolnej, zwłaszcza do wykorzystania w uprawach rolniczych i ogrodnich oraz stymulacji wzrostu i rozwoju roślin.

Preparaty mikrobiologiczne stosowane są w uprawie roślin do ich ochrony przed chorobami i szkodnikami. Używa się również preparatów mikrobiologicznych do usprawnienia procesów życiowych roślin związanych z ich wzrostem i rozwojem, a także do poprawy właściwości fizykochemicznych gleb czy też np. rozkładu i mineralizacji materii organicznej takiej jak resztki pozbiorowe oraz nawozy naturalne. Jak wiadomo z praktyki rolniczej, stosowanie preparatów mikrobiologicznych powoduje m.in. przyrost plonu, ograniczenie narażenia roślin na choroby, lepsze wykorzystanie przez rośliny składników pokarmowych zawartych w glebie oraz ich lepsze i szybsze ukorzenianie. Niektóre preparaty mikrobiologiczne redukują również stres abiotyczny tj. stres wywołany przez niekorzystne czynniki zewnętrzne takie jak np. susza, mróz i chłód, stres po stosowaniu herbicydów, zanieczyszczenia środowiska toksycznymi substancjami lub metalami ciężkimi.

Wpływ preparatów mikrobiologicznych, zawierających w swoim składzie mikroorganizmy, na gleby i na rośliny nie wynika z ich

bezpośredniego udziału w regulacji procesów życiowych, lecz z oddziaływania związków aktywnych jakie owe bakterie produkują, np. aminokwasów, enzymów, specyficznych białek, hormonów i innych związków organicznych, nieorganicznych i mineralnych. W zależności od wykorzystywanego w preparacie mikrobiologicznym rodzaju mikroorganizmu oraz szczepu, produkty posiadają różne właściwości oraz odpowiadają za inną jego funkcjonalność.

Znanymi i stosowanymi preparatami mikrobiologicznymi w rolnictwie są m.in. preparaty zawierające bakterie symbiotyczne roślin bobowatych uzyskane na bazie bakterii z grupy *Rhizobium*, czy też szczepionki mikoryzujące sadzonki drzew wytworzone na bazie grzybów *Trichoderma Spp.* Do biologicznej ochrony roślin stosuje się produkty zawierające mikroorganizmy takie jak *Alternaria*, *Trichoderma*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Streptomyces* i inne.

W publikacji M. Truba, K. Jankowski, J. Sosnowski pt. „Reakcja roślin na stosowanie preparatów biologicznych”, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych nr 53, 2012 r., przedstawiono przegląd znanych i stosowanych na rynku polskim biopreparatów. Przykładowo, znany jest preparat do użyźniania gleby występujący pod handlową nazwą UGMax, który przyspiesza procesy rozkładu masy organicznej i powoduje wzrost zawartości materii organicznej (próchnicy) w glebie. Preparat ten zawiera mikroorganizmy takie jak bakterie kwasu mlekowego, bakterie fotosyntetyczne, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, promieniowce i drożdże oraz makro i mikroelementy w ilości na 1 kg preparatu: 1,2 g N, 0,5 g P, 3,5 g K, 0,1 g Mg, 0,0003 g Mn, 0,2 g Na. Mikroorganizmy przetwarzają i kompostują nawozy naturalne oraz organiczne w celu wytworzenia próchnicy, co poprawia strukturę gleby. Preparat UGMax testowano na uprawach ziemniaków z pozytywnym skutkiem.

Inne opisane preparaty oparte są na technologii Efektywnych Mikroorganizmów (EM) i zawierają około 80 mikroorganizmów o pozytywnym oddziaływaniu na rośliny i glebę, w skład których wchodzi

m.in.: bakterie kwasu mlekowego, bakterie fotosyntetyczne, *Azotobacter* oraz drożdże i grzyby. Zwiększenie ilości pozytywnych mikroorganizmów w glebie zwiększa przyswajalność składników pokarmowych z materii organicznej i w konsekwencji poprawia żyzność i zdrowotność gleby.

Znany jest także preparat wspomagający rozwój roślin na ubogich zdegradowanych glebach, występujący pod nazwą Phylazonit M i zawierający mikroorganizmy takie jak *Azotobacter*, *Bacillus* oraz mikroelementy: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se.

Znany jest również preparat występujący pod nazwą handlową DiPel WG, wytworzony na bazie bakterii *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*, który jest selektywnie toksyczny dla gąsienic wielu szkodliwych gatunków motyli (Lepidoptera). Preparat DiPel WG stanowi alternatywę dla środków chemicznych w uprawach rolniczych, warzywniczych, sadowniczych oraz roślin ozdobnych, nie jest szkodliwy dla pożytecznych owadów drapieżnych i pasożytniczych, dlatego sprzyja zachowaniu równowagi biologicznej. Stosuje się go w dawce od 0,5 do 3,0 kg/ha. Zalecaną ilość wprowadza do zbiornika opryskiwacza zawierającego np. 500 - 1000 l/ha dla oprysków sadowniczych.

Bakterie wspomagają również procesy kompostowania odpadów. Przykładowo w publikacji K. Cybulskiego i inni: Inż. Ap. Chem., 2012, 51, 4, 108-111, opisano sposób kompostowania szczeciny świńskiej zmieszanej z wiórkami drzewnymi lub słomą zbożową, pyłem węgla brunatnego oraz granulowanymi odchodami kurzymi przy udziale szczepionki drobnoustrojowej zawierającej bakterie z rodzaju *Bacillus* w formie świeżej biomasy, grzyby strzępkowe *Trichoderma sp.* i promieniowce *Streptomyces sp.* w postaci zmywu z hodowli płytkowej. Zastosowanie takiej szczepionki pozwoliło na zwiększenie efektywności rozkładu szczeciny w porównaniu do niezaszczepionego kompostu kontrolnego.

Preparaty mikrobiologiczne przeznaczone do uprawy roślin są również przedmiotem licznych opisów patentowych.

Znane są z opisu patentowego PL217740 B1 preparaty do traktowania gleby i nasion roślin zawierające żywe mikroorganizmy lub mikroorganizmy zdolne do rozmnażania się w glebach, sposób wytwarzania produktów do traktowania gleby i nasion roślin, mikroorganizmy, sposób wytwarzania mikroorganizmów oraz sposób traktowania gleby i nasion roślin preparatami. Wynalazek dotyczy preparatów do traktowania gleby i nasion roślin zawierające żywe mikroorganizmy lub mikroorganizmy zdolne do rozmnażania się w glebach różnego typu w otoczeniu roślin, przy czym preparaty zawierają w ilości $5 \times 10^6 - 10^{11}$, korzystnie $10^7 - 10^{10}$ komórek/g kulturę *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291) oraz jeden lub większą liczbę mikroorganizmów spośród *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 0012 95), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294), *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302) i *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301), jako mikroorganizmów zdolnych do rozmnażania się również w niskiej temperaturze, korzystnie poniżej 20°C, jak również w glebach o niskiej wartości pH, korzystnie poniżej 5, zdeponowanych w Krajowej Kolekcji Mikroorganizmów do Użytku w Rolnictwie i Przemysle, Budapeszt, Węgry, oraz mokre lub suche nośniki dopuszczalne w uprawach rolniczych i nietoksyczne dla mikroorganizmów. Korzystne są preparaty, które jako nośnik zawierają wodę i/lub mączkę sojową i/lub skrobię i/lub celulozę i/lub glukozę. Preparaty zawierające komórki mikroorganizmów w liczbie $10^{10} - 10^{14}$, korzystnie $10^{11} - 10^{12}$ na hektar, nanosi się na powierzchnię lub do wnętrza gleby w porze roku, w której nie występuje spadek temperatury poniżej 0°C lub traktuje się nimi nasiona. Kulturę mikroorganizmów można wprowadzać bezpośrednio do zaprawianej gleby lub roślin wraz z pożywką stosowaną do jej hodowli, bądź w postaci preparatów zachowujących potencjał biotyczny mikroorganizmu, w tym

preparatów zawierających nośniki zapewniające przyleganie bakterii do nasion dzięki siłom adhezji.

Ze zgłoszenia PL376766 A1 znany jest biopreparat, zwłaszcza do mineralizacji odpadów, który zawiera żywe kultury bakterii przyspieszających mineralizację odpadów organicznych takie jak: *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas proteolytica*, *Pseudomonas psychrophila*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas agarici* oraz kultury bakterii *Bacillus denitrificans* i *Bacillus subtilis*. Żywe kultury bakterii przechowywane są na sterylnym podłożu na przykład agarowym. Tak skomponowany preparat pozwala znacznie skrócić okres mineralizacji odpadów organicznych i uzyskać z nich w efekcie procesu nadające się do zastosowania w rolnictwie podłoże.

Znany jest ze zgłoszenia PL292243 A1 biologiczny konserwant do kiszenia pasz zielonych, przeznaczony do właściwego ukierunkowania i przyspieszenia procesów fermentacyjnych zachodzących w czasie kiszenia pasz, składający się z bakteryjnego preparatu ze starterem i stabilizatora rozwoju komórek. Preparat zawiera połączone w proporcji od 1:0,5 do 1:1 kompozycję bakterii fermentacji mlekowej i kompozycję bakterii propionowych. Starterem jest glukoza użyta w ilości 0,4 - 0,6 %. Stabilizatorem jest mieszanina bezwodnego fosforanu jednoamionowego, użytego w ilości 0,4 - 0,6 % wag. z bezwodnym fosforanem dwusodowym, użytym w ilości 1,4 - 1,8 % wag., przy czym suchy konserwant zawiera łącznie około 10^{11} komórek w 1 gramie.

Znany jest z opisu patentowego RO126081 B1 biopreparat przeznaczony do zwalczania grzybów z rodzaju *Fusarium* powodujących choroby roślin, który składa się z 1 – 20 % zawiesiny mikroorganizmów: *Saccharomyces cerevisiae* L30 (numer depozytu NCAIM Y001350) i *Bacillus subtilis* B49b (numer depozytu NCAIM (P) 001360 B), korzystnie między 4 – 8 % każdego szczepu, 2 – 15 % składników odżywczych, 5 - 15% środków powierzchniowo czynnych, 10 – 50 % rozpuszczalnika,

0,01 - 1% stabilizatora, 1 – 10 % antykoagulantów i wody destylowanej w ilości do 100 %.

Znana jest z opisu patentowego US6232270 B1 kompozycja przeznaczona do stosowania w rolnictwie zawierająca kultury bakterii *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* lub nowy szczep *Bacillus* ATCC 55675. Kompozycję stosuje się w formie wodnego roztworu o koncentracji bakterii od 300000 do 1500000 cfu/ml, korzystnie od 1000000 do 1200000 cfu/ml, również w mieszaninie z innymi substancjami czynnymi stosowanymi w rolnictwie takimi jak fungicydy, insektycydy lub herbicydy

Z opisu patentowego RU2147181 C1 znany jest biopreparat do zwiększenia plonów roślin i ochrony roślin przed chorobami, który zawiera hydrolizat bakterii *Pseudomonas aureofaciens* VKM V- 1973D w ilości 18-20 części wagowych, hydrolizat bakterii *Bacillus megaterium* w ilości 39 - 40 części wagowych, ekstrakt z igieł sosnowych w ilości 5 - 6 części wagowych, pastę z chlorofilu i karotenu w ilości 1-2 części wagowych oraz roztwór makro- i mikroelementów w ilości 32-37 części wagowych.

Z opisu patentowego RU2314693 C2 znany jest biopreparat do poprawy żyzności gleby i jej odkażania o właściwościach stymulujących wzrost roślin, zawierający szczepy bakterii *Bacillus subtilis* K-4, *Bacillus subtilis* Be-12 i *Bacillus amyloliquefaciens* w ilości 30-40 % wagowych, zestawionych w stosunku 1-5 : 1-5 : 1-5 i wypełniacze w ilości 20-30 % wagowych, takie jak kaolin i mączka sojowa, środek zapachowy zawierający wyciąg z drzew iglastych oraz pastę chlorofilowo-karotenową w ilości 2,3-4,0 %.

W dobie intensyfikacji produkcji rolnej, rolnicy oczekują efektywniejszego wykorzystania wprowadzanych do gleb nawozów. Zawartość substancji organicznej w glebach użytkowanych rolniczo obniża się o około 2% rocznie. Jednym z powodów obniżania zawartości substancji organicznej w glebach jest zaleganie słomy na polach lub jej pozarolnicze wykorzystywanie, np. poprzez spalanie biomasy. Konieczne

jest więc okresowe wprowadzanie do gleb nawozów uzupełniających w różnych postaciach.

Jak wiadomo z praktyki rolniczej, resztki poźniwne są cennym źródłem substancji organicznej.

Prowadzone od szeregu lat badania wskazują, że 5 ton słomy średnio zawiera do: 35 kg N, 15 kg P₂O₅, 110 kg K₂O, 10 kg MgO, 20 kg CaO, 8 kg S, 25 g B, 200g Zn, 150 g Mn i 15 g Cu. Jednak te cenne nawozowo substancje są dostępne roślinom w formie przyswajalnej dopiero po dekompozycji resztek poźniwnych przez mikroorganizmy obecne w glebie, zwłaszcza bakterie celuloityczne. Stąd też znalezienie metody szybszego rozkładu resztek poźniwnych pozwoliłoby na wzrost plonów dzięki zwiększeniu dostępności dla roślin cennych składników odżywczych oraz związków próchnicznych niezbędnych do ich prawidłowego wzrostu i rozwoju, przy jednoczesnym zmniejszeniu dodatkowego nawożenia.

Nieoczekiwanie okazało się, że rozkład resztek poźniwnych można przyspieszyć stosując preparat mikrobiologiczny zawierający żywe lub zdolne do rozmnażania się w glebie wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106), zdeponowane w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Preparat mikrobiologiczny do mineralizacji materii organicznej zawierającej zwłaszcza celulozę, zawiera zgodnie z wynalazkiem żywe lub zdolne do rozmnażania się w glebie wyselekcjonowane szczepy bakteryjne, makro i/lub mikroelementy, a ponadto związki biologicznie czynne o właściwościach przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, substancje stabilizujące preparat mikrobiologiczny przed niepożądaną destabilizacją oraz ewentualnie wodę.

Istota rozwiązania charakteryzuje się tym, że preparat zawiera zdeponowane w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu szczepy bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105)

i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106), w ilości 10^1 - 10^{12} komórek/g preparatu, korzystnie 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu, immobilizowane na nośniku w postaci minerału glinokrzemianowego, korzystnie z grupy bentonitów montmorylonitowych i/lub attapulgitowych, o średniej wielkości cząsteczek od 0,001 do 0,07 mm, stanowiącym od 0,01 do 5 % mas. preparatu.

Korzystnie szczepy bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) są zestawione w preparacie w proporcji 1:1.

Ponadto preparat zawiera w ilości do 40 % masowych co najmniej jeden makro lub mikroelement, korzystnie w formie rozpuszczalnej w wodzie, wybrany z grupy obejmującej takie pierwiastki jak: azot, fosfor, potas, magnez, wapń, krzem, tytan, bor, miedź, żelazo, mangan, molibden, cynk, kobalt.

Korzystnie preparat zawiera do 40 % wagowych azotu, do 25 % wagowych fosforu, do 20 % wagowych potasu, do 20 % wagowych krzemu, do 25 % wagowych magnezu, do 10 % wagowych wapnia, do 10 % wagowych boru, do 12 % wagowych żelaza, do 10 % wagowych manganu, do 10 % wagowych molibdenu, do 10 % wagowych cynku, do 10 % wagowych kobaltu, do 5 % wagowych miedzi, do 3 % wagowych tytanu.

Korzystnie preparat zawiera substancje o zdolnościach do chelatowania mikroelementów, w szczególności: EDTA w ilości od 0,01 do 5 % masowych, HEDTA w ilości od 0,01 do 5 % masowych, DTPA w ilości od 0,01 do 5 % masowych, HEEDTA w ilości od 0,01 do 5 % masowych, aminokwasy w ilości od 0,01 do 5 % masowych, kwasy fulwowe w ilości od 0,01 do 5 % masowych, cukry proste w ilości od 0,01 do 5 % masowych, wielocukry w ilości od 0,01 do 5 % masowych, polifenole w ilości od 0,01 do 5 % masowych, witaminy w ilości od 0,01 do 5 % masowych.

Korzystnie preparat zawiera ewentualnie związki biologicznie czynne o właściwościach przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych wybrane z grupy obejmującej polifenole, kwasy wielonienasycone, florotaniny, siarczanowane polisacharydy, karotenoidy, peptydy, zawarte w preparacie w ilości od 0,01 do 5 % masowych.

Korzystnie preparat zawiera ewentualnie hormony roślinne, w tym: fitosterole - cytokininy, auksyny, gibereliny w ilości od 0,01 do 5 % masowych.

Korzystnie preparat zawiera ewentualnie płyn pochodzący oraz metabolity wytwarzane przez bakterie w trakcie hodowli w ilości od 0,1 do 95 % masowych.

Korzystnie pH preparatu zawiera się w przedziale od 2 do 12, a najlepiej od 6 do 8 i jest regulowane za pomocą kwasu lub zasady, korzystnie kwasu cytrynowego, kwasu solnego, kwasu siarkowego, wodorotlenków i/lub węglanów metali alkalicznych, zwłaszcza sodu lub potasu.

Istotą rozwiązania jest także zastosowanie preparatu mikrobiologicznego, zawierającego żywe lub zdolne do rozmnażania się w glebie wyselekcjonowane szczepy bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) w ilości 10^1 - 10^{12} komórek/g preparatu, korzystnie 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu, do mineralizacji materii organicznej zawierającej zwłaszcza celulozę w uprawach rolniczych i ogrodniczych, do aplikacji pozakorzeniowej i/lub dokerzeniowej, po rozcieńczeniu preparatu wodą w zakresie od 0,02 do 5 % masowych.

Korzystne jest zastosowanie, w którym preparat zawiera płyn z hodowli bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106), korzystnie wzbogacony o składniki mineralne i/lub organiczne.

Preparat mikrobiologiczny wytworzony na bazie szczepów bakteryjnych *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus*

licheniformis 4/18 (PCM B/00106), wykazuje zdolność przyspieszenia procesu rozkładu celulozy zawartej w materii organicznej, dzięki czemu m.in. uniemożliwia rozwój czynników chorobotwórczych rozwijających się na pozostałościach poźniwnych, pozytywnie wpływa na właściwości gleb, a w szczególności na jej strukturę, dostępność mikro i makroskładników, pojemność wodną oraz działa stymulująco na wzrost i rozwój roślin rolniczych i ogrodniczych. Szczepy bakterii użyte do stworzenia preparatu mikrobiologicznego są zdolne do produkcji m.in. enzymów celulolitycznych, które przyspieszają rozkład pozostałości poźniwnych, a jednocześnie dostarczają do gleby łatwo przyswajalne dla roślin składniki odżywcze.

Preparat nadaje się do przechowywania w postaci roztworu lub w postaci stałej, mając przy tym ograniczone tendencje do destabilizacji.

Wprowadzenie do preparatu co najmniej jednego z makro i/lub mikroelementów takich jak azot, fosfor, potas, magnez, wapń, siarka, bor, miedź, żelazo, mangan, molibden, cynk, kobalt, tytan, krzem, w formie rozpuszczalnej w wodzie stymuluje bakterie do szybszej i efektywniejszej syntezy enzymów celulolitycznych oraz ogranicza tendencję biopreparatu do destabilizacji.

Składniki pokarmowe takie jak azot, fosfor, potas, magnez, siarka, węgiel, bor, miedź, żelazo, mangan, molibden, cynk, cukry i wielocukry, oprócz właściwości stabilizujących roztwór wpływają korzystnie na poprawę plonowania roślin rolniczych i ogrodniczych.

Preparat utrzymuje silne stymulujące oddziaływanie na wzrost i rozwój roślin przy zastosowaniu dolistnie i/lub donasiennie i/lub pozakorzeniowo.

Przedmiot wynalazku jest bliżej określony w poniższych przykładach, nie ograniczających jego zakresu.

Przykład 1

Preparat mikrobiologiczny w postaci roztworu zawiera następujące szczepy bakteryjne w ilości 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu:

- 5 % masowych inokulum szczepu bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105),

- 5 % masowych inokulum szczepu bakterii *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106),

- 0,06% bentonitu o średniej wielkości cząsteczek od 0,001 do 0,07 mm, makro i mikroelementy:

Azot (N) - 13,087% masowych,

Fosfor (P_2O_5) - 0,067 % masowych,

Potas (K_2O) - 0,043 % masowych,

Magnez (MgO) - 0,009 % masowych,

Siarka (SO_3) - 0,064 % masowych,

Bor (B) - 0,001 % masowych,

Żelazo (Fe) - 0,009 % masowych,

Mangan (Mn) - 0,009 % masowych,

Cynk (Zn) - 0,009 % masowych,

oraz

- 0,418 % masowych kwasu cytrynowego,

składniki odżywcze bakterii:

- 0,093 % masowych karboksymetylocelulozy CMC,

- 0,093 % masowych Peptonu K,

i rozpuszczalnik:

- 75,94 % masowych wody.

Szczegółową procedurę przygotowania inokulum przeprowadzono zgodnie z polskim zgłoszeniem patentowym pt. Sposób przygotowania inokulum bakterii celulolitycznych do wytwarzania biopreparatów poprawiających właściwości gleby, nr P.414429 z dnia 19.10.2015 r.

Szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) oraz *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) wyizolowano ze środowiska naturalnego, poprzez pobranie ich z podłoża do produkcji pieczarek, wymieszanie z jałowym roztworem soli fizjologicznej, wykonaniu szeregu rozcieńczeń, a następnie namnożenie na podłożu zawierającym Pepton K, CMC, agar, żelatynę i wodę jako dopełnienie do 100 % masowych.

Namnażanie bakterii prowadzono przez okres 48 godzin w temperaturze nie niższej niż 32°C do momentu uzyskania na podłożu pojedynczych kolonii bakterii. Szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106). Następnie bakterie osadzono na skosach agarowych z zestaloną pożywką z bulionu i inokulum przechowywano w kriobanku w niskich temperaturach.

W celu sporządzenia preparatu mikrobiologicznego w formie płynnej, do sterylnego reaktora wyposażonego w mieszadło i możliwość podgrzewania dodano 50 ml inokulum szczepu *Bacillus subtilis* B/00105 i 50 ml inokulum *Bacillus licheniformis* B/00106 oraz 306 g mocznika, 100 g wody i mieszano w temperaturze 35 - 40°C przy obrotach 50 obr/min przez 1 minutę. Następnie przy intensywnym mieszaniu wskazanych powyżej ilościach, a mieszaninę przy intensywnym mieszaniu uzupełniono wodą do objętości 1 litra.

Aktywność szczepów Szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) w rozkładzie celulozy.

Próbki Szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i/lub *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) hodowano w roztworze zawierającym:

1 % pepton kazeinowy,

1 % CMC,

0,2 % K_2HPO_4 ,

1,5 % agar,

0,03 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

0,25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

0,2 % żelatynę.

Aktywność celulolityczna oznaczona została zgodnie z metodą wykorzystującą kwas 3,5 – dinitrosalicylowy (DNS). W celu oznaczenia ilości zredukowanych cukrów, źródło enzymów stanowił supernatant uzyskany po odwirowaniu prób w określonych godzinach hodowli (parametry wirowania: 4500 obr/min x 10 min/14°C). Supernatant w ilości 1 ml został następnie dodany do 0,5 ml odpowiedniego substratu:

- 1 % CMC zawieszonego w 0,05 M buforze fosforanowym,

- Bibuły Wathmana (1cm x 6 cm, masa 50 mg) zawieszona w 0,05 M buforze cytrynianowym.

Całość poddana została inkubacji w łaźni wodnej o temperaturze odpowiednio 30°C lub 50°C. Czas inkubacji wynosił 60 minut. Po tym czasie reakcja została przerwana za pomocą DNS (1,5 ml), a następnie próby przeniesiono do łaźni wodnej o temperaturze 100°C. Po upływie 5 minut, próby ochłodzono i rozcieńczono wodą destylowaną (12 ml).

Ilość uwolnionych cukrów prostych mierzono za pomocą spektrofotometru.

Absorbancja mierzona była przy długości fali równej 530 nm. Próbę zerową stanowiła woda destylowana oraz DNS.

Jako jednostkę aktywności [U], przyjęto ilość glukozy [μmol] uwolnionej przez 1 ml enzymu w czasie 1 minuty:

$$1 U = \frac{1 \mu\text{mol}_{\text{glukozy}}}{1} \text{min}$$

Badania potwierdzające znaczące przyspieszenie rozkładu celulozy przez szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) oraz *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) były prowadzone w porównaniu do innych szczepów bakterii o aktywności celulolitycznej.

Ocenę aktywności izolatów *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) oraz *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) w rozkładzie celulozy (źródło celulozy CMC, temp. 30 i 50°C) przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1

DNS - 30°C / CMC + bufor fosforanowy						
Izolat	24 h		48 h		72 h	
	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średni a	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średni a	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średni a
<i>Bacillus subtilis</i> 4/7 (PCM B/00105)	0,1581	0,1574	0,3014	0,3018	0,3504	0,3635
	0,1566		0,3021		0,3766	
4/10 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0616	0,0664	0,0699	0,0706	0,1344	0,1032
	0,0712		0,0712		0,0720	
4/20 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0780	0,0790	0,0702	0,0698	0,0813	0,0868
	0,0799		0,0693		0,0922	
4/22 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0738	0,0695	0,0619	0,0618	0,1015	0,1003
	0,0652		0,0617		0,0991	
2/15 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0580	0,0633	0,0589	0,0566	0,1502	0,1431
	0,0686		0,0542		0,1360	
4/3 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0527	0,0458	0,0527	0,0680	0,1539	0,1633
	0,0388		0,0833		0,1726	
4/11 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0514	0,0539	0,0481	0,0574	0,1440	0,2552
	0,0564		0,0666		0,3663	
<i>Bacillus licheniformis</i> 4/18 (PCM B/00106)	0,1553	0,1967	0,3244	0,3292	0,4473	0,4551
	0,2380		0,3339		0,4628	

Tabela 2

DNS - 50°C / CMC + bufor fosforanowy						
Izolat	24 h		48 h		72 h	
	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średni a	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średni a	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średni a
<i>Bacillus subtilis</i> 4/7 (PCM B/00105)	0,1750	0,1866	0,3516	0,3521	0,3818	0,4068
	0,1981		0,3525		0,4317	
4/10 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0834	0,0833	0,0899	0,0919	0,1296	0,1263
	0,0832		0,0939		0,1229	
4/20 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0793	0,0879	0,0945	0,0926	0,0658	0,0698
	0,0965		0,0906		0,0738	

4/22 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0976	0,0948	0,0846	0,0848	0,0843	0,0821
	0,0919		0,0850		0,0799	
2/15 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0647	0,0676	0,0767	0,0785	0,2180	0,1855
	0,0704		0,0803		0,1530	
4/3 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0581	0,0597	0,0840	0,1013	0,1666	0,1973
	0,0612		0,1186		0,2279	
4/11 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0581	0,0616	0,0847	0,0945	0,1405	0,1881
	0,0651		0,1042		0,2357	
<i>Bacillus licheniformis</i> 4/18 (PCM B/00106)	0,2127	0,2530	0,3934	0,3862	0,4984	0,5172
	0,2933		0,3790		0,5359	

Ocenę aktywności enzymatycznej metodą DNS izolatów pochodzących ze źródeł nr 2 i nr 4 (źródło celulozy bibuła, temp. 30 i 50°C) przedstawiono w tabelach 3 i 4.

Tabela 3

DNS - 30°C / bibuła + bufor cytrynianowy						
Izolat	24 h		48 h		72 h	
	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średnia	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średnia	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średnia
<i>Bacillus subtilis</i> 4/7 (PCM B/00105)	0,1763	0,1693	0,2853	0,3023	0,3772	0,3729
	0,1623		0,3192		0,3685	
4/10 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,1025	0,0980	0,1007	0,1067	0,1416	0,1413
	0,0935		0,1126		0,1409	
4/20 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0910	0,0895	0,1072	0,1090	0,0851	0,0945
	0,0880		0,1107		0,1039	
4/22 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,1057	0,1068	0,1082	0,1014	0,1070	0,1105
	0,1079		0,0946		0,1139	
2/15 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0934	0,0931	0,0989	0,0932	0,1447	0,1358
	0,0928		0,0874		0,1268	
4/3 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0828	0,0850	0,0849	0,0966	0,1669	0,1752
	0,0872		0,1082		0,1835	
4/11 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0826	0,0868	0,0750	0,0876	0,1278	0,1620
	0,0910		0,1002		0,1962	
<i>Bacillus licheniformis</i> 4/18 (PCM B/00106)	0,1620	0,1956	0,3364	0,3402	0,3886	0,4026
	0,2291		0,3440		0,4166	

Tabela 4

DNS - 50°C / bibuła + bufor cytrynianowy						
Izolat	24 h		48 h		72 h	
	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średnia	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średnia	Absorbancja [530 nm]	Absorbancja [530 nm] średnia
<i>Bacillus subtilis</i> 4/7 (PCM B/00105)	0,2302	0,2229	0,3656	0,3599	0,3696	0,3608
	0,2155		0,3542		0,3519	
4/10 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,1053	0,1116	0,1612	0,1546	0,1432	0,1464
	0,1179		0,1480		0,1495	
4/20 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,1129	0,1170	0,1237	0,1253	0,0935	0,0926
	0,1210		0,1269		0,0916	
4/22 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,1157	0,1263	0,1193	0,1099	0,1001	0,1053
	0,1368		0,1005		0,1104	
2/15 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0889	0,0885	0,1111	0,1046	0,1572	0,1444
	0,0880		0,0981		0,1315	
4/3 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0880	0,0880	0,1062	0,1204	0,1397	0,1649
	0,0880		0,1346		0,1901	
4/11 - szczep bakterii o aktywności celulolitycznej	0,0942	0,0950	0,1097	0,1162	0,1064	0,1608
	0,0957		0,1227		0,2152	
<i>Bacillus licheniformis</i> 4/18 (PCM B/00106)	0,2322	0,2301	0,3743	0,3872	0,4216	0,4183
	0,2280		0,4000		0,4149	

Przykład 2

Preparat mikrobiologiczny w postaci roztworu zawiera następujące szczepy bakteryjne w ilości 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu:

- 15 % masowych inokulum szczepu bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105),
- 5 % masowych inokulum szczepu bakterii *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106),
- 0,06% bentonitu o średniej wielkości cząsteczek od 0,001 do 0,07 mm, makro i mikroelementy:

Azot (N) - 23,087 % masowych,
Fosfor (P_2O_5) - 1,067 % masowych,
Potas (K_2O) - 0,143 % masowych,
Magnez (MgO) - 0,009 % masowych,
Siarka (SO_3) - 0,064 % masowych,
Mangan (Mn) - 0,009 % masowych,
Cynk (Zn) - 0,009 % masowych,

oraz

- 0,418 % masowych kwasu cytrynowego,
składniki odżywcze bakterii:
 - 0,093 % masowych karboksymetylocelulozy CMC,
 - 0,093 % masowych Peptonu K,
- i rozpuszczalnik:
- 64,83 % masowych wody.

Przykład 3

Preparat mikrobiologiczny w postaci roztworu zawiera następujące szczepy bakteryjne w ilości 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu:

- 35 % masowych inokulum szczepu bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105),
 - 35 % masowych inokulum szczepu bakterii *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106),
 - 0,06 % bentonitu o średniej wielkości cząsteczek od 0,001 do 0,07 mm,
- i rozpuszczalnik:
- 29,94 % masowych wody.

Przykład 4

Preparat mikrobiologiczny w postaci roztworu zawiera następujące szczepy bakteryjne w ilości 10^9 komórek/g preparatu:

- 75 % masowych inokulum szczepu bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105),
- 0,06% bentonitu o średniej wielkości cząsteczek od 0,001 do 0,07 mm,
- i rozpuszczalnik:
- 24,94 % masowych wody.

Przykład 5

Preparat mikrobiologiczny zawierający szczepy bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) zestawione w proporcji 1:1 w ilości 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu zastosowano w uprawie rzepaku na resztki poźniwne w ilości 1 L/ha preparatu oraz 2L/ha, po jego uprzednim rozcieńczeniu w 300L wody. Przyrost masy korzeni po 7 tygodniach od aplikacji w porównaniu do kontroli i preparatów bakteryjnych konkurencji dostępnych na rynku pokazano w tabelach poniżej, gdzie tabeli 5 przedstawiono suchą masę części nadziemnej rzepaku w terminach poboru prób, a w tabeli 6 suchą masę korzeni rzepaku w terminach poboru prób.

Tabela 5

Obiekt	Czas od aplikacji preparatu
	7 tygodni
Kontrola	105,6 g
Preparat mikrobiologiczny wg wynalazku w dawce 1 L/ha	151,2 g (wzrost o 43,18 % w stosunku do kontroli)
Preparat mikrobiologiczny wg wynalazku w dawce 2 L/ha	140,7 g (wzrost o 33,23 % w stosunku do kontroli)
1 Preparat bakteryjny konkurencji	115,7 g (wzrost o 9,56 %

	w stosunku do kontroli)
2 Preparat bakteryjny konkurencji	113,4 g (wzrost o 7,38 % w stosunku do kontroli)

Tabela 6

Obiekt	Czas od aplikacji preparatu
	7 tygodni
Kontrola	18,91 g
Preparat mikrobiologiczny wg wynalazku w dawce 1 L/ha	28,85 g (wzrost o 52,56 % w stosunku do kontroli)
Preparat mikrobiologiczny wg wynalazku w dawce 2 L/ha	29,64 g (wzrost o 56,74 % w stosunku do kontroli)
1 Preparat bakteryjny konkurencji	26,62 g (wzrost o 40,77 % w stosunku do kontroli)
2 Preparat bakteryjny konkurencji	28,73 g (wzrost o 51,93 % w stosunku do kontroli)

Przykład 6

Wyautoklawowaną glebę przesypano do doniczek. Następnie do każdej doniczki wrzucono pociętą słomę pszeniczną i opryskano preparatem mikrobiologicznym zawierający szczepy bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) zestawione w proporcji 1:1 w ilości 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu, w ilości odpowiadającej dawce 2 L/ha. Słomę wymieszano z ziemią i pozostawiono na 8 tygodni, w tunelu foliowym, w jasnym i słonecznym miejscu. Po 8 tygodniach glebę ze słomą, w poszczególnych doniczkach ponownie wymieszano, a następnie wysiano pszenicę ozimą odmiany

BAMBERKA. Do każdej doniczki wysiano po 100 ziaren pszenicy. Po 4 tygodniach od wysiewu rośliny z poszczególnych doniczek zebrano, a następnie zważono masę całych rośliny oraz masę części nadziemnej.

Przyrost masy korzeni po 4 tygodniach od wysiewu w porównaniu do kontroli wyniósł 30 %.

Przyrost masy części nadziemnej po 4 tygodniach od wysiewu w porównaniu do kontroli wyniósł 12%.

Przykład 7

Preparat mikrobiologiczny zawierający szczepy bakterii *Bacillus subtilis* 4/7 (PCM B/00105) i *Bacillus licheniformis* 4/18 (PCM B/00106) zestawione w proporcji 1:1 w ilości 10^8 - 10^9 komórek/g preparatu zastosowano na resztki poźniwne w ilości 2 L/ha preparatu, po jego uprzednim rozcieńczeniu w 300 L wody. Po ok. 2 miesiącach po aplikacji pobrano próbki gleby i wykonano analizę zawartości wybranych pierwiastków.

Wzrost zawartości miedzi po ok. 2 miesiącach od aplikacji preparatu, w porównaniu do kontroli wyniósł 5,91%.

Wzrost zawartości żelaza po ok. 2 miesiącach od aplikacji preparatu, w porównaniu do kontroli wyniósł 6,4%.

Wzrost zawartości manganu po ok. 2 miesiącach od aplikacji preparatu, w porównaniu do kontroli wyniósł 8,78%.

Wzrost zawartości cynku po ok. 2 miesiącach od aplikacji preparatu, w porównaniu do kontroli wyniósł 11,39%.

Wzrost zawartości potasu po ok. 2 miesiącach od aplikacji preparatu, w porównaniu do kontroli wyniósł 6,979%.