

Biopreparaty na bazie mikroorganizmów do ochrony roślin przed zakażeniami bakteryjnymi do zastosowania w rolnictwie

Wynalazek dotyczy biopreparatów stanowiących kompozycję mikroorganizmu(ów) - substancja czynna oraz substancji dodatkowych w opracowanej formulacji. Wynalazek umożliwia utrzymanie żywotności mikroorganizmów, będących środkami ochrony biologicznej roślin, podczas długotrwałego przechowywania. Wynalazek znajduje zastosowanie do ochrony roślin przed chorobami zwłaszcza bakteryjnymi, np. powodowanymi przez bakteryjne patogeny pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*.

Jednym z głównych wyzwań w komercyjnym stosowaniu biologicznych środków ochrony roślin - biopestycydów jest ich przygotowanie do aplikacji w warunkach polowych i przemysłowych. Najważniejszym składnikiem każdego środka tego typu jest substancja czynna, którą w biologicznej ochronie roślin, tzw. biokontroli, najczęściej stanowi mikroorganizm lub mikroorganizmy. Jednakże obecność samej substancji czynnej (mikroorganizmu(ów)) jest często niewystarczająca z perspektywy komercyjnego zastosowania, stąd do preparatu dodaje się różne substancje dodatkowe, których zadaniem jest zwiększenie aktywności gotowego biopestycydu i/albo umożliwienie jego przechowywania i/albo zwiększenie łatwości i bezpieczeństwa jego zastosowania. Połączenie substancji czynnej i substancji dodatkowych w procesie technologicznym nosi nazwę formulacji. Preparaty skutecznie poddane formulacji muszą umożliwiać biologicznym środkom kontroli/ochrony utrzymanie żywotności podczas długotrwałego przechowywania. Wybór skutecznej metody formulacji szczepu do biologicznej ochrony roślin nie jest prosty, szczególnie w przypadku nieprzetrwalnikujących bakterii Gram-ujemnych. Ze względu na różnorodność budowy i metabolizmu mikroorganizmów, a także różne mechanizmy ich działania w biologicznej ochronie, nie istnieje jedyna powszechnie stosowana metoda zachowania żywotności szczepów bakteryjnych. Ponadto poddany formulacji produkt musi być zgodny z wymaganiami docelowego systemu uprawy, być bezpieczny w użyciu i być stosunkowo niedrogi w zastosowaniu.

Biopreparaty można wytwarzać jako substancje stałe lub ciecze. Preparaty w stanie stałym obejmują proszki i granule, podczas gdy ciekłe preparaty zawierają komórki mikroorganizmów zawieszane w nośniku na bazie wody lub na bazie oleju. Każdy z rodzajów formulacji oferuje różne korzyści. Na przykład granulki zawierające bakterie kapsułkowane umożliwiają stabilne uwalnianie mikroorganizmów do środowiska, a zatem są korzystne dla

zastosowań w glebie, w których krytyczne jest czasowe uwalnianie mikroorganizmów (np. bakterii antagonistycznych). Z kolei proszki, zawierające wysuszone bakterie, zwykle zapewniają najlepszy okres trwałości formulacji, ale wymagają zastosowania odpowiedniej metody suszenia mikroorganizmów np. liofilizacji. Niedogodnością zastosowania formulacji stałej jest często duże pylenie się preparatu co jest niebezpieczne, a zatem wymaga się opracowania rozwiązania aby nie było zbyt pyłne z uwagi na bezpieczeństwo zastosowania. W przeciwieństwie do tego, preparaty ciekłe są najprostsze do przygotowania, są kompatybilne z większością sprzętu rolniczego i nadają się również do stosowania jako opryski naliściowe. Jednocześnie preparaty ciekłe nie są tak stabilne jak preparaty stałe i na ogół zapewniają krótszy okres przechowywania i gorszą aktywność formułowanych mikroorganizmów.

Z tego względu poszukuje się gotowych preparatów – biopestycydów o określonej formulacji – do zastosowania w rolnictwie do ochrony roślin przed zakażeniami, które charakteryzowałaby stosunkowa długa żywotność biologicznej substancji aktywnej, łatwość przygotowywania i bezpieczeństwo stosowania.

Nieoczekiwanie problem zapewnienia wysokiej przeżywalności wybranych bakterii Gram-ujemnych o aktywności w biologicznej ochronie roślin, przy jednoczesnej łatwości ich aplikacji oraz skuteczności w ochronie tkanek roślinnych, został rozwiązany w niniejszym wynalazku z wykorzystaniem opracowanych biopreparatów sypkich - formulacji, dalej opisywanych jako WP z ang. wettable powders, zawierających, jako substancję czynną, pojedyncze szczepy mikroorganizmów w formie liofilizatu (*Serratia plymuthica* A294 lub *Enterobacter amnigenus* A167 lub *Rahnella aquatilis* H145 lub *Serratia rubidaea* H440 lub *S. rubidaea* H469) lub mieszany tych szczepów w formie liofilizatu, a także wybrane substancje dodatkowe według opracowanej formulacji, mającej efektywność dla wybranych mikroorganizmów.

Wynalazek stanowi kontynuację badań doświadczalnych twórców przedmiotowego wynalazku. Ze wcześniejszych badań wiadome było, że szczepy stanowiące substancję czynną biopreparatów według wynalazku, w formie aktywnej metabolicznie (świeże hodowle nie poddane formulacji), wykazują aktywność w biologicznej ochronie bulw ziemniaka przed mokrą zgnilizną powodowaną przez bakterie pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* w warunkach przechowywania bulw, co opisano w publikacji badań eksperymentalnych: Krzyżanowska et al., 2018, w czasopiśmie *Plant Disease*

(<https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1866-RE>), polskim zgłoszeniu patentowym P.423806 z dnia 08.12.2017 i europejskim zgłoszeniu patentowym EP18210901.7.

Opracowane według obecnego wynalazku biopreparaty zawierają wybrane szczepy z wymienionych poniżej szczepów mikroorganizmów, osobno lub w mieszaninie, w opracowanej formulacji sypkiej umożliwiającej zastosowanie produktu z długą żywotnością biologiczną substancji aktywnej, łatwością przygotowywania i bezpieczeństwem stosowania. Szczepy użyte w formulacji pojedynczo oraz mieszaninie pięciu szczepów:

- szczep bakterii antagonisticznej *Serratia plymuthica* czyli szczep A294 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00143, w dniu 1 grudnia 2017 roku;
- szczep bakterii antagonisticznej *Serratia rubidaea* czyli szczep H469 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00142, w dniu 1 grudnia 2017 roku.
- szczep bakterii antagonisticznej *Serratia rubidaea* czyli szczep H440 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00141, w dniu 1 grudnia 2017 roku.
- szczep bakterii antagonisticznej *Enterobacter amnigenus* czyli szczep A167 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00145, w dniu 1 grudnia 2017 roku..
- szczep bakterii antagonisticznej *Rahnella aquatilis* czyli szczep H145 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00144, w dniu 1 grudnia 2017 roku.

Wyboru najbardziej efektywnych biopreparatów dokonano na podstawie badań wielu opracowanych kompozycji - biopreparatów kontrolnych i biopreparatów według wynalazku w danej formulacji i porównaniu ich skuteczności w badaniach eksperymentalnych, co szerzej przedstawiono w przykładach wykonania. Wynalazek stanowi więc opracowanie połączenia

opracowanej formulacji sypkiej z zastosowaniem w niej danego, wybranego szczepu bakterii, celem zwiększenia skuteczności środka aktywnego w biopreparacie gotowym do użycia.

W celu sprawdzenia dobrej trwałości (stabilności) półkowej biopreparatów na bazie mikroorganizmów przeprowadzono dodatkowe badania, które potwierdzają wyższość zastosowania biopreparatów sypkich o danym składzie według wynalazku zawierających wybrane szczepy bakterii nad zastosowaniem badanych szczepów bez formulacji, zastosowaniem szczepów poddanych formulacji do postaci biopreparatów płynnych czy też biopreparatów sypkich zawierających określone szczepy, które wykazały się niższą skutecznością. Wykazano również, że opracowane – wybrane kompozycje biopreparatów - umożliwiają zachowanie przez organizmy żywotności oraz zdolności efektywnej ochrony tkanki roślinnej przed chorobami bakteryjnymi, co wykazano w badaniach na bulwach ziemniaka zakażonych bakteriami pektynolitycznymi z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*.

Sposób otrzymania oraz skuteczność wybranych opracowanych biopreparatów zawierających wybrane szczepy bakterii w opracowanej formulacji przedstawiono w przykładach wykonania oraz na rysunku. Na Fig. 1 przedstawiono miano bakterii w kolejnych punktach czasowych dla różnych formulacji przechowywanych w 8 °C przez okres 12 miesięcy. Lot 1 i Lot 2 odnoszą się do różnych partii formulacji badanych w niezależnych eksperymentach. CTRL – kontrola bakterie bez formulacji zawieszono w ¼ buforze Ringer's; LQ – formulacja płynna; WP-KAO formulacja sypka z kaolinem; WP-DE – formulacja sypka z ziemią okrzemkową. Na fig. 2 przedstawiono wpływ metody formulacji na stabilność półkową szczepów atagonistycznych przechowywanych w 8 °C przez okres 12 miesięcy. Analiza została wykonana dla danych zebranych dla wszystkich szczepów. Każda ramka pokazuje nachylenie krzywej przeżywalności (zmiana w \log_{10} jtk na ml formulacji płynnej lub g formulacji sypkiej). Im wyższa (bliższa zero) wartość nachylenia krzywej tym mniejszy spadek liczby żywych komórek, w $\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ lub $\text{jtk} \cdot \text{ml}^{-1}$ na każdy miesiąc przechowywania. CTRL – kontrola bakterie bez formulacji zawieszono w ¼ buforze Ringer's; LQ – formulacja płynna; WP-KAO formulacja sypka z kaolinem; WP-DE – formulacja sypka z ziemią okrzemkową. Różniące się litaery oznaczają statystycznie istotną różnicę w wartościach nachylenia krzywej (t-test, $\alpha = 0.05$). Na fig. 3 przedstawiono stopień porażenia mokrą zgniilizną (A, B) oraz występowanie choroby (C, D) dla ziemniaków ko-infiltrowanych mieszniną szczepów antagonistycznych oraz mieszaniną bakterii pektynolitycznych, po okresie przechowywania inokulowanych bulw przez 6 miesięcy w 8 °C. Wyniki z dwóch

niezależnych eksperymentów (1 i 2). Stopień porażenia został określony w skali symptomów (0-5). NC - kontrola negatywna, ziemniaki infiltrowane wodą; PC - kontrola pozytywna, ziemniaki infiltrowane wodą, a następnie mieszniną bakterii pektynolitycznych; pozostałe próby były infiltrowane mieszniną bakterii antagonistycznych, a następnie mieszaniną bakterii pektynolitycznych, gdzie FR to mieszanina bakterii świeżo wyhodowanych (bez formulacji i okresu przechowywania), WP-KAO - biopreparat sypki z kaolinem; WP-DE – biopreparat sypki z ziemią okrzemkową. Różniące się litery oznaczają różnice istotne statystycznie ($\alpha = 0,05$) w teście Dunna (A i B) lub Chi^2 (C, D).

Przykład 1

Przygotowanie i skład biopreparatów według wynalazku i biopreparatów kontrolnych

Pięć wybranych gram-ujemnych szczepów bakteryjnych o potencjale do zastosowania w biopreparatach: *Serratia plymuthica* A294, *Enterobacter amnigenus* A167, *Rahnella aquatilis* H145, *Serratia rubidaea* H440 i *S. rubidaea* H469, osobno i w postaci mieszaniny, zostało poddanych formulacji do biopreparatów o postaci dwóch typów opracowanych według wynalazku kompozycji proszków do sporządzania zawiesin, formulacja dalej opisywana jako WP z ang. *wettable powders*, WP. Formulacje proszkowe do sporządzenia zawiesin bakterii nadano nazwy odpowiadające zastosowanych w nich nośnikach: kaolinowi (WP-KAO) lub ziemi okrzemkowej (WP-DE, od ang. *diatomaceous earth*). Sporządzono również inne formulacje, aby wytypować najlepsze tj. płynną (LQ) oraz, a aby zapewnić punkt odniesienia, zawiesinę kontrolną zawierającą bakterie niepoddane formulacji (CTRL, od ang. *control*).

W zakresie dodatków poprawiających właściwości formulacji zastosowano wybrane komponenty zastosowane dla wszystkich badanych rodzajów formulacji: 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4 . Wybrano metylocelulozę w celu roli środka zwilżającego, β -cyclodekstrynę jako związku ograniczającego szkodliwe działanie promieniowania UV, lignosulfonian sodu pełniący w kompozycji rolę dyspergatora, a KH_2PO_4 stabilizatora. Szczegółowy skład trzech formulacji WP-KAO, WP-DE, LQ oraz próby kontrolnej CTRL przedstawiono w Tabeli 1.

Biopreparaty płynne, LQ i CTRL, przygotowano na bazie komórek bakteryjnych z hodowli prowadzonych przez 16-24 godzin w 28°C na pożywce mikrobiologicznej stałej: Bulion Tryptonowo Sojowy z dodatkiem agaru (15 g * l⁻¹) (TSBA). Zebrane komórki zawierano w buforze ¼ Ringers'a tak, aby osiągnąć miano bakterii na poziomie ok. 10¹⁰-10¹¹ jednostek tworzących kolonie na mililitr (jtk * ml⁻¹). Biopreparaty płynne LQ zawierała ponadto wymienione substancje dodatkowe, w proporcjach wagowo-objętościowych opisanych w Tabeli 1.

W celu przygotowania biopreparatów o postaci proszków według wynalazku do sporządzenia zawiesin WP-KAO i WP-DE, wysuszono komórki bakterii. W tym celu zastosowano liofilizację. Aby przeprowadzić ten proces, bakterie hodowano przez noc (16-24 godzin) w pożywce płynnej: Bulion Tryptonowo Sojowy (TSB) w temperaturze 28°C. Bakterie osadzono przez wirowanie (6500 rcf, 5 min) i zawieszono w odczynniku do liofilizacji: Reagent PS. Odczynnik do liofilizacji zawiera na każde 100 mL objętości odczynnika: 0,75g TSB, 10g sacharozy i 0,255g peptonu pszenicznego jest przygotowywany przez rozpuszczenie w wodzie demineralizowanej wszystkich składników ww. i jałowieniu tak przygotowanego roztworu w temperaturze 121°C przy 0,7 Atm, przez 15 minut. Po jałowieniu i schłodzeniu do temperatury pokojowej odczynnik jest gotowy do użycia. Zastosowanie akurat odczynnika Reagent PS na etapie liofilizacji nie jest jednak obligatoryjne do efektu według wynalazku. Istotnym jest zastosowanie liofilizacji celem wysuszenia bakterii. Liofilizaty bakterii będące składnikami biopreparatów WP-KAO i WP-DE mogą zostać przygotowane także według innej znanej procedury np. z wykorzystaniem buforu do liofilizacji, zawierającym jeden składnik (np. bufor zawierający roztwór 10% odtłuszczonego mleka w wodzie, bufor zawierający 10% roztwór sacharozy w wodzie), albo kilka (np. Reagent 18 rekomendowany przez ATCC – American Type Culture Collection – o składzie na 100 ml roztworu: 1,5 g trypticase soya broth - bulion tryptonowo sojowy, 10 g sacharozy, 5 g BSA – bovine serum albumin – albumina serum bydlęcego).

Następnie, zawiesiny bakterii w Reagent PS zamrożono przez noc w -80 °C, a następnie liofilizowano w liofilizatorze w -50 °C przez 24h. W ten sposób otrzymano liofilizaty bakterii (sproszkowane bakterie). Miano bakterii w liofilizatach określono metodą seryjnych rozcieńczeń dla wodnych zawiesin naważonych porcji proszku. Seryjne rozcieńczenia zawiesin wysiewano na odpowiednie podłoża wzrostowe zestalone agarem i ostateczne

przeliczenie miana bakterii na gram liofilizatu ($\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$). W celu otrzymania gotowych sypkich biopreparatów WP-DE i WP-KAO, do liofilizatu bakterii (ok. 10^{10} - 10^{11} $\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$) dodawano odpowiednie składniki pomocnicze w proporcjach (% wagowy) jak opisano w Tabeli 1. W przypadku gdy element formuacji stanowił liofilizat zawierający nie pojedynczy szczep, ale mieszaninę szczepów, liofilizat wskazany jako element formuacji stanowił mieszaninę liofilizatów dla pojedynczych szczepów w równych proporcjach wagowych.

Tabela 1. Skład badanych - testowanych formuacji oraz próby kontrolnej (bez formuacji – same mikroorganizmy).

Nazwa	Typ formuacji	Skład ^A
WP-DE	Proszek do sporządzania zawiesiny	60% liofilizat bakterii wybranych szczepów pojedynczo lub w mieszaninie jak opisano w tabeli 2 i 3 (ok. 10^{10} - 10^{11} $\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$), 29,9% ziemia okrzemkowa, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
WP-KAO	Proszek do sporządzania zawiesiny	60% liofilizat bakterii (ok. 10^{10} - 10^{11} $\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$), 29,9% kaolin, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
LQ	Formuacja płynna	89,9% zawiesina komórek (ok. 10^{10} - 10^{11} $\text{jtk} \cdot \text{ml}^{-1}$) w jałowym buforze 1/4 Ringer's, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
CTRL – kontrola (brak formuacji)	Próba kontrolna	100% zawiesina komórek (ok. 10^{10} - 10^{11} $\text{jtk} \cdot \text{ml}^{-1}$) w jałowym buforze 1/4 Ringer's

^A Dla formuacji sypkich WP-KAO i WP-DE podano stosunek wagowy. Dla formuacji płynnej (LQ) podano stosunek wagowo-objętościowy, z zawiesiną bakterii w postaci płynnej oraz pozostałymi składnikami w postaci sypkiej. Dla formuacji zawierających więcej niż jeden szczep bakteryjny, liofilizat wymieniony w Tabeli stanowił mieszaninę tych szczepów w różnych proporcjach (w/w).

Wykazano znaczącą poprawę bezpieczeństwa z zastosowania opracowanej według wynalazku formulacji WP. Ważnym efektem zastosowania nośników w biopreparatach sypkich, kaolinu w przypadku WP-KAO i ziemi okrzemkowej w przypadku WP-DE, było znaczące zmniejszenie się pylenia i elektryzowania liofilizatów stanowiących główny komponent otrzymanych preparatów. Efektywność ta była widoczna w opracowanych według wynalazku biopreparatach. Jest to bardzo istotne z perspektywy wygody ale przede wszystkim bezpieczeństwa zastosowania badanych biopreparatów gdyż ogranicza niekorzystną ekspozycję wziewną końcowego użytkownika preparatu w warunkach jego aplikacji.

Przykład 2

Przeżywalność bakterii poddanych formulacji podczas przechowywania biopreparatów (stabilność półkowa)

Oceniono stabilność pułkową wszystkich analizowanych biopreparatów: sypkich w opracowanej formulacji WP-KAO i WP-DE oraz badanej formulacji płynnej LQ. Proces formulacji do postaci biopreparatów przeprowadzono dla wybranych pięciu pojedynczych szczepów bakteryjnych :A294, A167, H145, H440 i H469, wcześniej opisanych oraz dla ich mieszanin. Przygotowane biopreparaty przechowywano przez okres do jednego roku w temperaturach 8 i 22 °C. Testowane temperatury odwzorowywały możliwość przechowywania biopreparatów w, odpowiednio, temperaturze pokojowej i w warunkach chłodniczych. Jako kontrolę wykorzystano bakterie bez formulacji (CTRL). Biopreparaty sypkie umieszczono w jałowych, zamykanych probówkach wirowniczych z plastiku, a biopreparaty płynne oraz kontrolę w butelkach szklanych z ciemnego szkła, ze szlifem i szklanymi korkami.

Próbowki lub butelki przechowywano zbiorczo w plastikowych pudełkach z silikonowym osuszaczem. Próbkę biopreparatów pobrano zaraz po ich przygotowaniu, a następnie po określonych okresach przechowywania. Przygotowywano seryjne rozcieńczenia próbek i wysiewano je na podłoża wzrostowe aby obliczyć miano bakterii ($\text{jtk} \cdot \text{ml}^{-1}$ lub g^{-1}) i tym samym określić odsetek komórek, które zachowały żywotność w danym biopreparacie

lub kontroli. Próbkę biopreparatów przechowywanych w 8 °C pobrano po 1, 2, 3, 6, 9 i 12 miesiącach. Przygotowano dwie testowane niezależnie partie biopreparatów, oznaczone jako Lot 1 i Lot 2, każda zawierająca po dwa powtórzenia techniczne dla danej kombinacji. Próbkę biopreparatów przechowywanych w 22 °C pobrano po 1, 2, 3 i 6 miesiącach i tylko dla jednej partii (Lot 1). Skrócony czas eksperymentu dla przechowywania w 22 °C wynikał z dużego spadku żywotności bakterii w tej temperaturze.

Szczegółowe wyniki dla miana bakterii w każdej z prób przedstawiono w Tabeli 2 (dla 22 °C) oraz w Tabeli 3 (dla 8 °C). Dodatkowo, dla prób przechowywanych w 8 °C, wyznaczono krzywe przeżywalności poszczególnych szczepów w badanych biopreparatach, co przedstawiono na Fig. 1. Otrzymane wyniki pokazują, że przeżywalność szczepów ochronnych w zaproponowanych biopreparatach jest zależna od temperatury ich przechowywania – liczba żywych komórek bakterii szczepów ochronnych jest stabilna w temperaturze 8 °C, natomiast w temperaturze 22 °C liczba żywych komórek ulega szybkiemu obniżeniu w czasie. Efekt ten jest obserwowany zarówno dla formułacji sypkich jak i płynnych. Z tego względu wyboru biopreparatów stanowiących niniejszy wynalazek opracowano na podstawie porównania wszystkich opracowanych biopreparatów w badaniach w temperaturze 8 °C, co przedstawiono w Tabeli 3. Z badań wynika, że w odniesieniu do kontroli bez formułacji (CTRL), zastosowanie formułacji WP-KAO, korzystnie wpływa zarówno na przeżywalność wszystkich testowanych 5 szczepów bakterii antagonistycznych jak i ich mieszaniny zawierającej wszystkie 5 szczepów. Dla wszystkich szczepów przeżywalność w postaci formułacji WP-KAO jest też wyższa niż w formułacji płynnej LQ. Zastosowanie drugiego typu formułacji sypkiej, WP-DE, również wpływa korzystnie na przeżywalność wszystkich 5 szczepów w odniesieniu do kontroli bez formułacji (CTRL). W przypadku odniesienia wyników przeżywalności w postaci WP-DE do formułacji płynnej (LQ), zaobserwowano wzrost przeżywalności w odniesieniu do 4 z 5 szczepów bakterii (oprócz szczepu *S. plymuthica* A294) i ich 5-cio składnikowej mieszaniny. Niemniej jednak wyniki przeżywalności dla WP-DE i LQ dla szczepu *S. plymuthica* A294 były na analogicznym, wysokim poziomie, nie wykluczając tym samym przydatności formułacji WP-DE dla tego szczepu i jej dużą aktywność. Na podstawie przeprowadzonych badań wybrano najbardziej skuteczne biopreparaty, stanowiące kompozycję mikroorganizmów i formułacji, których przykładowy skład przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 2. Miano bakterii (\log_{10} jtk $\cdot \text{ml}^{-1}$ lub g^{-1}) w badanych formuacjach bakterii przechowywanych w 22 °C.

Szczep	Formulacja ^A	Czas przechowywania (miesiące)					Nachylenie ^c	
		0	1	2	3	6		
<i>E. amnigenus</i>	A167	CTRL	10.30 ^B	8.69	8.17	8.19	7.12	-0.454
		LQ	10.31	9.09	7.82	6.88	5.96	-0.708
		WP-KAO	11.03	10.44	9.26	8.80	8.30	-0.454
		WP-DE	10.92	10.32	9.15	8.36	8.70	-0.376
<i>R. aquatilis</i>	H145	CTRL	10.31	7.57	7.20	6.88	6.50	-0.504
		LQ	10.16	8.46	8.28	8.11	7.08	-0.433
		WP-KAO	10.74	8.95	6.64	6.11	6.03	-0.735
		WP-DE	10.77	9.04	6.26	6.45	6.00	-0.733
<i>S. plymuthica</i>	A294	CTRL	10.31	8.20	7.55	7.89	7.65	-0.329
		LQ	10.09	8.98	9.13	7.10	7.26	-0.473
		WP-KAO	10.20	8.97	8.15	8.06	7.46	-0.407
		WP-DE	10.02	8.27	8.22	7.67	7.58	-0.331
<i>S. rubidaea</i>	H440	CTRL	10.44	8.52	7.97	8.27	8.03	-0.297
		LQ	10.50	9.17	8.72	8.29	7.19	-0.504
		WP-KAO	11.32	11.19	10.64	10.49	8.86	-0.419
		WP-DE	11.15	10.90	10.09	10.21	8.91	-0.371
<i>S. rubidaea</i>	H469	CTRL	10.37	8.51	8.52	8.41	8.11	-0.282
		LQ	10.38	9.25	9.26	8.67	7.60	-0.424
		WP-KAO	11.10	9.82	9.94	10.00	9.44	-0.206
		WP-DE	10.98	10.29	9.70	9.82	9.68	-0.183
Mieszanka 5 szczepów		CTRL	10.35	8.35	8.01	8.44	7.92	-0.290
		LQ	10.34	9.10	8.84	8.37	7.08	-0.499
		WP-KAO	10.79	10.45	9.34	9.66	8.58	-0.357
		WP-DE	11.03	10.26	9.23	9.38	8.37	-0.413

^A Formulacje: CTRL – bakterie bez formuacji; LQ – formuacja płynna. Formulacje sypkie: WP-KAO - formuacja sypka z kaolinem; WP-DE – formuacja sypka z ziemią okrzemkową

^B Miano bakterii w \log_{10} jtk * mL^{-1} dla CTRL i LQ oraz w \log_{10} jtk * g^{-1} dla formulacji sypkich (WP-KAO, WP-DE). Każda wartość to średnia z dwóch powtórzeń technicznych.

^C Nachylenie krzywej przeżywalności wyrażające średni spadek w mianie bakterii (\log_{10} jtk) na miesiąc przechowywania.

Na podstawie przeprowadzonych wyników badań eksperymentalnych w zakresie skuteczności biopreparatów na bazie wybranych szczepów bakterii opracowano kompozycje przedstawione w Tabeli 4, które charakteryzują się najwyższą skutecznością co do najwyższej przeżywalności użytych szczepów: *E. amnigenus* A167, *R. aquatilis* H145, *S. plymuthica* A294, *S. rubidaea* H440 i *S. rubidaea* H469. Wyniki dokładniej przedstawiono poniżej i na Figurach. Istotnym są również dane z tabeli 3. W tabeli 3 przedstawiono miano bakterii (\log_{10} jtk * mL^{-1} lub g^{-1}) w badanych formulacjach bakterii przechowywanych w 8 °C. Dla każdego szczepu wyróżniono przez pogrubienie dwie formacje o średnim nachyleniu krzywej przeżywalności (AVG) jak najbliższym wartości „0”, co przekłada się na mały spadek liczby żywych komórek w czasie i wysoką trwałość półkową preparatu.

Biopreparaty o formulacji proszkowej (ang. wettable powder, WP), o kompozycji według Tabeli 4, zawierają liofilizat pojedynczych szczepów bakterii o właściwościach w biologicznej ochronie roślin lub ich mieszaniny (substancja czynna) oraz substancje dodatkowe ograniczające pylenie i stabilizatory według opracowanych kompozycji.

Tabela 4. Skład wybranych i opracowanych biopreparatów według wynalazku - formulacje.

Nazwa biopreparatu	Substancja czynna	Skład ^A
A167 WP-DE	<i>E. amnigenus</i> A167	60% liofilizat bakterii <i>E. amnigenus</i> A167 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% ziemia okrzemkowa, 5% metyloceluloza, 0,1% β - cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
A167 WP-KAO	<i>E. amnigenus</i> A167	60% liofilizat bakterii <i>E. amnigenus</i> A167 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% kaolin, 5%

		metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
H145 WP-DE	<i>R. aquatilis</i> H145	60% liofilizat bakterii <i>R. aquatilis</i> H145 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% ziemia okrzemkowa, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
H145 WP- KAO	<i>R. aquatilis</i> H145	60% liofilizat bakterii <i>R. aquatilis</i> H145 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% kaolin, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
A294 WP-DE	<i>S. plymuthica</i> A294	60% liofilizat bakterii <i>S. plymuthica</i> A294 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% ziemia okrzemkowa, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
A294 WP- KAO	<i>S. plymuthica</i> A294	60% liofilizat bakterii <i>S. plymuthica</i> A294 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% kaolin, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
H440 WP-DE	<i>S. rubidaea</i> H440	60% liofilizat bakterii <i>S. rubidaea</i> H440 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% ziemia okrzemkowa, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
H440 WP- KAO	<i>S. rubidaea</i> H440	60% liofilizat bakterii <i>S. rubidaea</i> H440 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% kaolin, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
H469 WP-DE	<i>S. rubidaea</i> H469	60% liofilizat bakterii <i>S. rubidaea</i> H469 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% ziemia okrzemkowa, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
H469 WP- KAO	<i>S. rubidaea</i> H469	60% liofilizat bakterii <i>S. rubidaea</i> H469 (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g^{-1}), 29,9% kaolin, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH_2PO_4
Mieszanina WP-	Mieszanina 5	60% liofilizat mieszaniny 5 szczepów

DE	szczepów ^B	bakterii ^B (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g ⁻¹), 29,9% ziemia okrzemkowa, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH ₂ PO ₄
Mieszanina WP-KAO	Mieszanina 5 szczepów ^B	60% liofilizat mieszaniny 5 szczepów bakterii ^B (ok. 10^{10} - 10^{11} jtk * g ⁻¹), 29,9% kaolin, 5% metyloceluloza, 0,1% β -cyclodekstryna, 4% lignosulfonian sodowy, 1% KH ₂ PO ₄

^A Podano stosunek wagowy.

^B Mieszanina 5 szczepów zawiera szczepy: E. amnigenus A167, R. aquatilis H145, S. plymuthica A294, S. rubidaea H440, S. rubidaea H469.

Aby porównać pomiędzy sobą stabilność półkową badanych biopreparatów, porównano nachylenia krzywej przeżywalności (x) wyrażające średni spadek przeżywalności szczepów poddanych formulacji na miesiąc przechowywania. Nachylenie krzywej zostało wyliczone za pomocą poniższego wzoru:

$$x = \frac{\sum(t_i - \bar{t})(y_i - \bar{y})}{\sum(t_i - \bar{t})^2}$$

Gdzie y_i oznacza liczbę jednostek tworzących kolonie (\log_{10} jtk * g⁻¹ lub \log_{10} jtk * ml⁻¹) w odpowiadającym czasie próbkowania (t_i , w miesiącach), \bar{y} oznacza średnią wszystkich wartości y_i , a \bar{t} oznacza średnią wszystkich wartości t_i . Im wyższa (bliższa zero) wartość nachylenia krzywej tym mniejszy spadek liczby żywych komórek, w jtk * g⁻¹ lub jtk * ml⁻¹ na każdy miesiąc przechowywania.

Dodatkowo, poza porównaniem przeżywalności dla pojedynczych szczepów w badanych kombinacjach (biopreparatach) porównano także globalną skuteczność zastosowanych metod formulacji. Wykonane w tym celu porównanie średniej przeżywalności bakterii dla danych zgrupowanych dla wszystkich szczepów oraz mieszaniny wykazały statystycznie istotnie mniejszy spadek liczby żywych komórek w formulacjach sypkich WP-

KAO i WP-DE w stosunku do kontroli (CTRL), co przedstawiono na fig. 2. W formulacji płynnej LQ wyniki plasowały się pomiędzy kontrolą a formulacjami sypkimi, jednak miano żywych komórek było niższe dla formulacji płynnej niż dla formulacji sypkich według wynalazku, co przedstawiono na Fig. 1 i Fig. 2, spadając do około 1 % wartości początkowej. Biopreparaty sypkie z ziemią krzemkową (WP-DE) i kaolinem (WP-KAO) charakteryzowały się dobrą przeżywalnością szczepów ochronnych, na poziomie 50%-100% po 6 miesiącach przechowywania, zależnie od badanego szczepu. Przeprowadzona analiza globalna pokazuje ogólną przewagę zastosowania formulacji WP-KAO i WP-DE nad zastosowaniem formulacji LQ lub brakiem formulacji (CTRL). Wybrane kompozycje przedstawione w Tabeli 4 charakteryzowały się zatem najwyższą skutecznością dla wszystkich testowanych szczepów. Wyjątek stanowi kombinacja szczepu *S. plymuthica* A294 i formulacji WP-DE, dla którego przeżywalność w tym biopreparacie była dobra, ale nie wyróżniająco lepsza niż dla kombinacji tego szczepu i formulacji LQ.

Przykład 3

Zdolność biopreparatów do zachowania biokontrolnej efektywności szczepów bakteryjnych

W celu określenia wpływu formulacji szczepów do postaci biopreparatów na bazie kaolinu (WP-KAO) i ziemi krzemkowej (WP-DE) na zdolność do biologicznej ochrony roślin (aktywność biologiczna) przeprowadzono eksperyment na bulwach ziemniaka w warunkach naśladujących komercyjne warunki przechowywania bulw (temp. 8 °C i wysoka wilgotność 85%-90% RH – ang. relative humidity). Na potrzeby eksperymentu wykorzystano wysokiej jakości sadzeniaki odmiany Irga (kaliber 30-50mm) o umiarkowanej odporności na mokrą zgniliznę (4 w 9-cio stopniowej skali <http://ziemniak-bonin.pl>), zakupione z Pomorsko-Mazurskiej Hodowli Ziemniaka Szydłak (<http://www.pmhz.pl/>). Ziemniaki zostały wysterylizowane poprzez 20 minutową inkubację w 5% roztworze wybielacza wypłukane 3 krotnie wodą wodociągową, umieszczone w pięciolitrowych zlewkach po 30 bulw. Biopreparaty sypkie według wynalazku WP-KAO i WP-DE przygotowane dla mieszaniny pięciu szczepów antagonistycznych (*Serratia plymuthica* A294, *Enterobacter amnigenus* A167, *Rahnella aquatilis* H145, *Serratia rubidaea* H440 i *S. rubidaea* H469) zostały wykorzystane do przygotowania zawiesin roboczych, otrzymanych poprzez dodanie 500 mg proszku na 1 litr wody wodociągowej (ok. 5×10^8 jtk mL⁻¹ bakterii antagonistycznych, na

podstawie liczby jtk * g⁻¹ w biopreparatach w dniu wykonywania eksperymentu). Zawiesiny wykorzystano do infiltracji próżniowej bulw ziemniaka bakteriami antagonistycznymi, prowadzonej przez 10 minut przy podciśnieniu -80 Bar i 10-minutową inkubację w tej samej zawieszynie po przywróceniu ciśnienia atmosferycznego. Jako próbę odniesienia przebadano równolegle zawieszinę bakterii antagonistycznych świeżo wyhodowanych przed eksperymentem (również około 5×10^8 jtk * ml⁻¹ dla wszystkich szczepów łącznie) (FR). Próba ta miała umożliwić porównanie skuteczności szczepów poddanych formulacji do postaci biopreparatów ze skutecznością aktywnych metabolicznie komórek bakterii. Następnego dnia po inokulacji bakteriami biokontrolnymi, po wysuszeniu bulw na powietrzu, ziemniaki inokulowano mieszaniną szczepów bakterii patogennych z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*: *P. atrosepticum* szczep SCRI 1043, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* szczep Ecc71, *P. parmentieri* szczep 16 SCC3193, *D. solani* szczep IPO2222 i *D. dianthicola* szczep CFBP 1200 (IPO1741), reprezentujących gatunki i podgatunki najczęściej powodujące mokrą zgniliznę w Europie. Zastosowano miano patogenów 10^6 jtk * ml⁻¹ dla wszystkich szczepów łącznie, czyli 2×10^5 jtk * ml⁻¹ każdego szczepu. Po inokulacji patogenami ziemniaki były suszone przez 1,5 h, a następnie zostały umieszczone w nieprzeziernych pojemnikach (26 × 18 × 12 cm) (5 pudełek po 30 ziemniaków = 150 na jedną próbę). Pudełka przechowywano w 8 °C przy wilgotności względnej 80% przez 6 miesięcy. Po półrocznej inkubacji w warunkach chłodniczych usunięto kiełki, a ziemniaki przeniesiono na 5 dni do warunków prowokacyjnych dla wystąpienia objawów mokrej zgnilizny (28°C, 85-90% wilgotności względnej). Eksperyment wykonano dwukrotnie. Niezależne powtórzenia oznaczono odpowiednio jako Eksperyment 1 i Eksperyment 2. Stopień porażenia (nasilenie symptomów chorobowych) na każdej badanej bulwie został oceniony z wykorzystaniem sześciostopniowej skali gdzie 0- brak symptomów, 1 - mokra zgnilizna pod skórą nie więcej niż 25% powierzchni, 2- mokra zgnilizna pod skórą 25-50% powierzchni ziemniaka, 3 – mokra zgnilizna pod skórą, występuje odwarstwienie perydermy 50-90% powierzchni, 4 - mokra zgnilizna zajmuje większą część powierzchni ziemniaka i sięga do wnętrza, 5 - ziemniak całkowicie zmacerowany. Poza stopniem występowania symptomów chorobowych oznaczono także odsetek bulw symptomatycznych (niezależnie od stopnia porażenia).

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pokazały, że pod względem oceny stopnia porażenia (skali symptomów) zastosowanie świeżo wyhodowanych bakterii

antagonistycznych (FR) zmniejszyło średnie nasilenie objawów o 83-94%. Efekty zastosowania biopreparatów sypkich, według wynalazku były bardzo dobre. Uzyskano redukcję symptomów o 69-72% dla zastosowania biopreparatów z ziemią okrzemkową (WP-DE) oraz o 62-64% dla zastosowania biopreparatów z kaolinem (WP-KAO) (Ryc. 3 A, B).

Pod względem częstości występowania symptomów morkej zgnizliny, niezależnie od stopnia ich nasilenia, aplikacja świeżo wychodowanych bakterii (FR) zmniejszyła tę wartość o 82-96%, a zastosowanie biopreparatów o 57-61% w przypadku formułacji z ziemią okrzemkową (WP-DE) oraz o 48-59% w przypadku biopreparatów z kaolinem (WP-KAO) (Ryc. 3 C, D).

Otrzymane wyniki pokazują, że najlepsze rezultaty można otrzymać przy użyciu świeżo wyhodowanych bakterii, tutaj zastosowanych jako kontrola skuteczności eksperymentu. Wynik ten nie jest zaskakujący, gdyż w preparacie tym bakterie są aktywne metabolicznie. Zastosowanie świeżych hodowli bakteryjnych nie jest jednak możliwe z perspektywy zastosowania komercyjnego – bakterie musiałyby zostać wyhodowane przez końcowego odbiorcę i wykorzystane bez okresu przechowywania (natychmiast po wyhodowaniu). Tymczasem zastosowanie biopreparatów sypkich według wynalazku pozwoliło nie tylko na zapewnienie długotrwałej żywotności szczepów (dobra trwałość półkowa), ale także na zachowanie nadal wysokiej zdolności tych szczepów do ochrony tkanek roślinnych przed patogenami.