



## **Sposób wytwarzania stymulatorów wzrostu roślin rolniczych oraz kompozycja je zawierająca i zastosowanie tych stymulatorów do poprawy wzrostu roślin rolniczych we wczesnym etapie ich rozwoju**

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania stymulatorów wzrostu roślin rolniczych, kompozycja je zawierająca i zastosowanie tych stymulatorów do poprawy wzrostu roślin rolniczych, zwłaszcza pszenicy i rzepaku we wczesnym etapie ich rozwoju. Wynalazek dotyczy dziedziny rolnictwa oraz ochrony środowiska.

Głównym wyzwaniem sektora rolnictwa, związanym ze wzrostem zapotrzebowania na żywność, jest zwiększenie roślinnej produkcji rolnej opartej na zasadach zrównoważonego rozwoju, ochrony środowiska i gospodarki obiegu zamkniętego [1, 2]. Obecnie postępujące zmiany klimatu oraz stosowanie niewłaściwych technik rolniczych w znacznym stopniu degradują agrocenozy, a szczególnie gleby, przez co ograniczają wydajność i jakość plonów [3, 4]. Jednym z najważniejszych elementów uprawy jest zapewnienie roślinom odpowiednich warunków do wzrostu. Początkowy etap wzrostu roślin jest kluczowy, ponieważ są one wtedy najbardziej wrażliwe na niekorzystne działanie czynników biotycznych i abiotycznych środowiska, m.in. takich czynników stresowych, jak niedobór wody, susza, okresowe zalewanie, wysokie, niskie temperatury i niedobór składników pokarmowych [5], których występowanie jest coraz częstszym zjawiskiem na wielu obszarach. W związku z tym, ciągle poszukuje się nowych rozwiązań, które w trudnych warunkach uprawy pozwolą zwiększyć rentowność produkcji. W odpowiedzi na potrzeby związane z zapewnieniem odpowiednich warunków do wzrostu roślin, coraz częściej, obok stosowania klasycznych nawozów, stosowane są stymulatory wzrostu, które m.in. zwiększają odporność roślin na biotyczne i abiotyczne stresse środowiskowe oraz poprawiają stan fizjologiczny roślin niezależnie od ilości dostarczanych im składników pokarmowych [6]. Do stymulatorów wzrostu roślin zalicza się więc różne związki, substancje i produkty, które są stosowane w celu poprawy przebiegu procesów fizjologicznych roślin, a zatem poprawy ich wzrostu, produktywności i w konsekwencji jakości plonu. Ważną cechą stymulatorów w myśl ich definicji jest użycie niskich lub nawet ultra niskich stężeń [7], co pozostaje ich

główną zaletą w porównaniu do nawozów lub innych agrochemikaliów z punktu widzenia środowiskowego i ekonomicznego. Stymulatory wzrostu mogą być odpowiedzialne m.in. za stymulację i wzmocnienie systemu korzeniowego, regulację i zwiększenie zdolności do zatrzymywania wody w komórkach oraz wspomaganie procesu fotosyntezy. Ważną zaletą stosowania stymulatorów wzrostu jest ich pozytywny wpływ na poprawę odporności naturalnej roślin, która związana jest m.in. z gospodarką fitohormonami. Fitohormony to hormony roślinne, wytwarzane i występujące w bardzo niskich stężeniach w komórkach roślinnych, których głównym zadaniem jest stymulowanie lub hamowanie wzrostu i rozwoju roślin na poszczególnych etapach wegetacji. Ich stężenie zależy od gatunku i odmiany, a także od fazy wzrostu danej rośliny. Poszczególne fitohormony wpływają na wiele różnorodnych procesów zachodzących w roślinie. Kwas abscysynowy (ABA) i kwas indoliloctowy (IAA) są odpowiedzialne za wzrost korzeni, kiełkowanie nasion, rozwój pąków i liści. Główną rolą fizjologiczną kwasu salicylowego (SA) i jasmonowego (JA) jest udział w odpowiedzi roślin na stresy biotyczne i abiotyczne.

Stymulatory wzrostu stosowane w rolnictwie są to najczęściej preparaty na bazie kwasów huminowych i fulwowych, hydrolizatów białkowych, aminokwasów i innych związków zawierających azot, ekstraktów z wodorostów, substancji pochodzenia roślinnego, chitozanu i innych biopolimerów, substancji nieorganicznych, tzw. mikroelementów korzystnych lub syntetycznych fitohormonów (auksyny, gibereliny) [8]. Odrębną grupę stymulatorów wzrostu roślin stanowią mikroorganizmy (bakterie promujące wzrost roślin lub grzyby mikoryzowe), które zaliczane są również do tzw. bionawozów [9, 10].

Z opisu P.403285 znany jest stymulator wzrostu roślin, który stanowi roztwór mieszaniny bazowych substancji występujących naturalnie w roślinach, p-nitrofenolanu potasu oraz o-nitrofenolanu potasu, gdzie do roztworu mieszaniny 4-nitrofenolanu potasu i 2-nitrofenolanu potasu dodano 5-nitrogwajakolan potasu, tj. 2-metoxy-5-nitrofenolan potasu.

Z opisu Pat.232329 znany jest sposób wytwarzania stymulatora wzrostu roślin z substancji naturalnych zawierających keratynę, poddanych obróbce wstępnej. Obróbka polega na usunięciu z nich zanieczyszczeń i tłuszczu, rozdrobnieniu do średniej wielkości cząstek 0,1 - 5 mm, kondycjonowaniu parą wodną i/lub wodą i/lub słabymi kwasami i/lub słabymi zasadami, a następnie poddaniu uzyskanego wkładu surowcowego hydrolizie chemicznej.

Z opisu Pat.244224 znany jest sposób wytwarzania nawozu o właściwościach stymulatora wzrostu roślin, zawierającego prekursorzy chlorofilu i aminokwasy, oparty na hydrolizatach kwaśnych i/lub alkalicznych krwi pochodzącej od zwierząt gospodarskich takich jak bydło, trzoda chlewna i drób.

Z opisu EP2194032 znany jest produkt do nawożenia biologicznego składający się z granulowanej formulacji zawierającej dwa szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum* i *Pantoea*, ze zdolnością do wiązania azotu atmosferycznego, do rozpuszczania fosforanów, jak również innych mineralnych składników odżywczych dla gleby i do wytwarzania dużych ilości substancji stymulujących wzrost roślin.

Odpady poprocesowe powstałe w wyniku wytwarzania polihydroksyalkanianów (PHA), które stanowią ważną grupę tzw. bioplastików będących środowiskową alternatywą dla syntetycznych tworzyw sztucznych [11], to materia organiczna (komórki bakterii pozostałe po ekstrakcji PHA) i związki nieorganiczne (niewykorzystane w procesie składniki medium hodowlanego). W literaturze niewiele jest jednak informacji na temat efektywnego wykorzystania tych potencjalnie cennych odpadów poprocesowych, co wpisuje się w strategiczne założenia gospodarki o obiegu zamkniętym [12, 13]. Szeroko stosowane nawożenie mineralne roślin bardzo często prowadzi do uzyskania negatywnych skutków środowiskowych [14]. Globalna produkcja bioplastików, w tym PHA, stale się zwiększa, dlatego też konieczne jest opracowanie efektywnych sposobów zagospodarowania odpadów poprocesowych, co może istotnie zwiększyć opłacalność produkcji ocenianej obecnie, jako stosunkowo droga [11].

Celem wynalazku jest zagospodarowanie odpadów poprocesowych produkcji PHA i dostarczenie nowych stymulatorów wzrostu ważnych gospodarczo roślin rolniczych tj. pszenicy i rzepaku na wczesnym etapie ich wzrostu i rozwoju.

Nieoczekiwanie cel wynalazku został osiągnięty, a wszystkie wyżej wskazane problemy techniczne zostały rozwiązane dzięki niniejszemu wynalazkowi.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kompozycji stymulatorów wzrostu roślin rolniczych z biomasy powstałej w procesie fermentacji bakteryjnej podczas produkcji polihydroksyalkanianów (PHA) obejmujący etapy:

- (a) biomasę bakteryjną poddaje się liofilizacji
- (b) prowadzi się ekstrakcję biopolimerów PHA z komórek bakteryjnych rozpuszczalnikiem organicznym,
- (c) biomasę bakteryjną po ekstrakcji PHA poddaje się hydrolizie chemicznej.

Korzystnie, rośliny rolniczych wybrane są z grupy obejmującej pszenicę i rzepak.

Korzystnie, biopolimery PHA produkuje się w procesie fermentacji bakteryjnej z glicerolu lub kwasów tłuszczowych.

Korzystnie, biomasę wytwarza się w produkcji biopolimerów PHA przy użyciu szczepu *Zobellella denitrificans* lub *Pseudomonas putida*.

Korzystnie, szczep wybrany jest z grupy obejmującej *Zobellella denitrificans* ZD1 lub *Pseudomonas putida* CA-3.

Korzystnie, rozpuszczalnik organiczny w pkt. b) stanowi chloroform lub octan etylenu.

Korzystnie, stosunek biomasy do rozpuszczalnika wynosi 1g na 10 ml.

Korzystnie, hydrolizę chemiczną suchej biomasy w pkt c) stanowi hydroliza kwasowa obejmująca poddanie biomasy działaniu kwasu nieorganicznego, zwłaszcza  $H_2SO_4$ .

Korzystnie, hydrolizaty otrzymane w pkt. c) rozcieńcza się do stężenia pozwalającego uniknąć stresu osmotycznego w roślinie, korzystnie w stosunku 1:200 hydrolizat : woda wodociągowa.

Drugim przedmiotem wynalazku jest kompozycja do stymulacji wzrostu roślin rolniczych zawierająca stymulatory wzrostu roślin otrzymane sposobem jak określono powyżej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji stymulatorów wzrostu roślin otrzymanych sposobem określonym powyżej do stymulacji wzrostu roślin rolniczych, zwłaszcza pszenicy i rzepaku.

W celu wytworzenia kompozycji stymulatorów wzrostu pszenicy i rzepaku wykorzystano zliofilizowaną biomasę po ekstrakcji biopolimerów PHA ze szczepów bakteryjnych *Zobellella denitrificans* i *Pseudomonas putida*.

Do wytworzenia biomasy bakteryjnej wykorzystano znane szczepy: *Pseudomonas putida* CA-3 zdeponowany pod numerem NCIMB 41162 (<https://www.ncimb.com>), oraz szczep *Zobellella denitrificans* ZD1 zdeponowany pod numerem DSM 19707 (<https://www.dsmz.de/>).

Wykorzystana biomasa składa się z pozostałości zliofilizowanych komórek bakteryjnych po wypłukaniu z nich biopolimeru PHA odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym. Polihydroksyalkaniany (PHA) wybrane są z grupy obejmującej m.in. poli(3-hydroksypropionian) (PHP lub P3HP), poli(3-hydroksymaślan) (PHB lub P3HB), poli(4-hydroksymaślan) (P4HB), poli(3-hydroksywalerianian) (PHV lub P3HV), poli(4-hydroksywalerianian) (P4HV), poli(5-hydroksywalerianian) (P5HV), poli(3-hydroksyheksanian) (PHHx lub P3HHx), poli(3-hydroksyoktanian) (PHO lub P3HO), poli(3-hydroksydekanian) (PHD lub P3HD), poli(3-hydroksyundekanian) (PHU, P3HU) lub inne nasycone lub nienasycone PHA o krótkim lub średnim łańcuchu; lub kwas polimlekowy (PLA); lub ich kopolimery lub dowolne ich kombinacje.

### **Przykład 1. Sposób wytwarzania stymulatorów wzrostu pszenicy i rzepaku**

#### Uzyskanie biomasy bakteryjnej ze szczepu *Zobellella denitrificans*

Polimer (1), czyli poli(3-hydroksybutyran) (P(3HB)), został wytworzony poprzez fermentację bakteryjną z glicerolu pozyskanego z hydrolizy oleju rzepakowego w temperaturze 42°C przy użyciu szczepu bakterii *Zobellella denitrificans* ZD1 zdeponowany pod numerem DSM 19707 (<https://www.dsmz.de/>).

Procesy fermentacji bakteryjnej prowadzono w fermentorach o objętości 5 l (Biostat B, Sartorius–Stedim, Gottingen, Niemcy). Początkowa objętość mieszaniny fermentacyjnej wynosiła 3 l. Proces fermentacji prowadzono w temperaturze 42°C. Wartość pH hodowli była automatycznie dostosowywana do poziomu 6,9±0,1 poprzez dodatek odpowiednio zasady (20% (v/v) roztworu amoniaku) bądź kwasu (15% (v/v) roztwór kwasu siarkowego VI). W trakcie procesu fermentacji, do mieszaniny fermentacyjnej podawano powietrze z prędkością 5 ml min<sup>-1</sup>. Prędkość początkową procesu fermentacji ustawiono na poziomie 500 rpm. Proces fermentacji

zaprogramowano w sposób kontrolujący stężenie rozpuszczonego tlenu na poziomie 20%. W związku z powyższym zarówno napowietrzanie, jak i prędkość obrotową dostosowywano, aby utrzymać wartość rozpuszczonego tlenu na ściśle ustanowionym poziomie. Fermentor posiadał czujnik piany, który umożliwiał automatyczne podawanie środka przeciw pianotwórczego (glikol polipropylenowy 2000 (PEG 2000)). Po zakończeniu procesu brzeczkę odwirowano przy prędkości obrotowej 4500 rpm przez 1 godzinę (Hettich RotaSilenta 630 RS – 6x 1l). Uzyskany bakteryjny pelet najpierw był mrożony poprzez umieszczenie go w zamrażarce laboratoryjnej (- 20°C).

#### Liofilizacja biomasy bakteryjnej

W następnym kroku pelet mrożono ciekłym azotem i poddawano procesowi suszenia sublimacyjnego (Labconco, MO, USA). Etap ten prowadzono do momentu całkowitego wysuszenia biomasy bakteryjnej.

#### Ekstrakcja biomasy rozpuszczalnikiem organicznym

Zbitą, wysuszoną biomasę kruszono, następnie zawieszano w rozpuszczalniku organicznym (chloroformie), przy zachowaniu stosunku 1 g biomasy na 10 ml rozpuszczalnika organicznego. Naczynie zawierające przygotowaną suspensję umieszczano na wytrząsarce laboratoryjnej (150 rpm, New Brunswick Excella E24R, Eppendorf, Niemcy). Biomasę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 dni. Następnie, mieszaninę pozostawiono w celu zdekantowania pozostałości komórek bakteryjnych, nadsącz filtrowano przez jakościowy filtr papierowy (rozmiar porów: 35–45 µm, typ 417, Avantor, Gliwice, Polska). Pozostałości bakteryjnych komórek (zwane tu biomasą) suszono w piecu (Binder FED400, Binder GmbH, Tuttlingen, Niemcy) w temperaturze 60°C przez 3 dni. W taki sposób otrzymywano biomasę bakteryjną.

#### Hydroliza chemiczna biomasy

Chemiczna hydroliza kwasowa suchej biomasy poekstrakcyjnej biopolimeru została przeprowadzona w następujących warunkach: suchą próbkę biomasy w ilości 120 g

zdyspergowano w 1,5 L 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Chempur, Piekary Śląskie, Polska) i ogrzewano w kolbie szklanej o pojemności 2 L zaopatrzonej w mieszadło mechaniczne w temperaturze 90°C przez 24 h. Po tym czasie roztwór przeniesiono do zlewki o pojemności 5 L i zobojętniono przez dodanie 0,3 L wodnego roztworu zawierającego 102 g KOH (Chempur, Piekary Śląskie, Polska). Następnie ciecz przefiltrowano na lejku ze spiekem i rozcieńczono przez dodanie 0,2 L wody destylowanej. Otrzymano ciecz o pH 6,1 oraz przewodnictwie elektrycznym 84 mS·cm<sup>-1</sup>.

### Uzyskanie biomasy bakteryjnej ze szczepu *Pseudomonas putida*

Polimer (2), czyli polimer amorficzny (aPHA) o średniej długości łańcucha, został wytworzony przez fermentację bakteryjną z kwasów tłuszczowych pochodzących z oleju rzepakowego w temperaturze 30°C przy użyciu szczepu bakterii *Pseudomonas putida* CA-3 zdeponowany pod numerem NCIMB 41162 (<https://www.ncimb.com>).

Procesy fermentacji bakteryjnej prowadzono w fermentorach o objętości 5 l (Biostat B, Sartorius-Stedim, Gottingen, Niemcy). Początkowa objętość mieszaniny fermentacyjnej wynosiła 3 l. Proces fermentacji prowadzono w temperaturze 30°C. Wartość pH hodowli była automatycznie dostosowywana do poziomu 6,9±0,1 poprzez dodatek odpowiednio zasady (20% (v/v) roztworu amoniaku) bądź kwasu (15% (v/v) roztwór kwasu siarkowego VI). W trakcie procesu fermentacji, do mieszaniny fermentacyjnej podawano powietrze z prędkością 5 ml min<sup>-1</sup>. Prędkość początkową procesu fermentacji ustawiono na poziomie 500 rpm. Proces fermentacji zaprogramowano w sposób kontrolujący stężenie rozpuszczonego tlenu na poziomie 20%. W związku z powyższym zarówno napowietrzanie, jak i prędkość obrotową dostosowywano, aby utrzymać wartość rozpuszczonego tlenu na ściśle ustanowionym poziomie. Fermentor posiadał czujnik piany, który umożliwiał automatyczne podawanie środka przeciw pianotwórczego (glikol polipropylenowy 2000 (PEG 2000)). Po zakończeniu procesu brzeczkę odwirowano przy prędkości obrotowej 4500 rpm przez 1 godzinę (Hettich RotaSilenta 630 RS – 6x 1l). Uzyskany bakteryjny pelet najpierw był mrożony poprzez umieszczenie go w zamrażarce laboratoryjnej (-20°C).

### Liofilizacja biomasy

W następnym kroku pelet mrożono ciekłym azotem i poddawano procesowi suszenia sublimacyjnego (Labconco, MO, USA). Etap ten prowadzono do momentu całkowitego wysuszenia biomasy bakteryjnej.

#### Ekstrakcja biomasy rozpuszczalnikiem organicznym

Zbitą, wysuszoną biomasę kruszono, następnie zawieszano w rozpuszczalniku organicznym (octanie etylu), przy zachowaniu stosunku 1 g biomasy na 10 ml rozpuszczalnika organicznego. Naczynie zawierające przygotowaną suspensję umieszczano na wyrząsarce laboratoryjnej (150 rpm, New Brunswick Excella E24R, Eppendorf, Niemcy). Biomasę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 dni. Następnie, mieszaninę pozostawiono w celu zdekantowania pozostałości komórek bakteryjnych, nadsącz filtrowano przez jakościowy filtr papierowy (rozmiar porów: 35–45  $\mu\text{m}$ , typ 417, Avantor, Gliwice, Polska). Pozostałości bakteryjnych komórek (zwane tu biomasą) suszono w piecu (Binder FED400, Binder GmbH, Tuttlingen, Niemcy) w temperaturze 60°C przez 3 dni. W taki sposób otrzymywano biomasę bakteryjną.

#### Hydroliza chemiczna biomasy

Chemiczna hydroliza kwasowa suchej biomasy poekstrakcyjnej biopolimeru została przeprowadzona w następujących warunkach: suchą próbkę biomasy w ilości 120 g zdyspergowano w 1,5 L 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Chempur, Piekary Śląskie, Polska) i ogrzewano w kolbie szklanej o pojemności 2 L zaopatrzonej w mieszadło mechaniczne w temperaturze 90°C przez 24 h. Po tym czasie roztwór przeniesiono do zlewki o pojemności 5 L i zobojętniono przez dodanie 0,3 L wodnego roztworu zawierającego 102 g KOH (Chempur, Piekary Śląskie, Polska). Następnie ciecz przefiltrowano na lejku ze spiekem i rozcieńczono przez dodanie 0,2 L wody destylowanej. Otrzymano ciecz o pH 6,5 oraz przewodnictwie elektrycznym 87  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### Ocena hydralizatów z suchej biomasy poekstrakcyjnej obu biopolimerów

Wytworzone hydrolizaty oceniono w zakresie: zawartość suchej masy, zawartość węgla organicznego, siarki ogólnej i składu pierwiastkowego. Zawartość węgla organicznego i siarki ogólnej oceniono metodą analizy elementarnej w analizatorze Vario Max Cube firmy Elementar. Przed analizą składu pierwiastkowego próbki obu hydrolizatów poddano mineralizacji na mokro w systemie zamkniętym wykorzystującym energię mikrofalową. Do mineralizacji użyto stężonego roztworu HNO<sub>3</sub> (Chempur, Piekary Śląskie, Polska) oraz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chempur, Piekary Śląskie, Polska) w stosunku 1:5 v/v. Zawartość pierwiastków oznaczano metodą spektrometrii emisji atomowej w aparacie Optima 6700 (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Parametry wykorzystywanych w analizie metod przedstawia Tabela 1.

Wariant 1 – zawierał biomasę po ekstrakcji PHA ze szczepu bakteryjnego *Zobellella denitrificans* (ZD1),

Wariant 2 – zawierał biomasę po ekstrakcji PHA ze szczepu bakteryjnego *Pseudomonas putida* (CA-3).

Tab. 1. Parametry wykorzystywanych w analizach metod spektrometrii emisji atomowej do oceny składu pierwiastkowego hydrolizatów.

| Pierwiastek | Długość fali | Limit detekcji         | Zawartość pierwiastka w materiale odniesienia | Zawartość pierwiastka zmierzona w materiale odniesienia | Współczynnik odzysku |
|-------------|--------------|------------------------|---|---|----------------------|
|             | [nm]         | [mg·dm <sup>-3</sup> ] | [mg·kg <sup>-1</sup> ]                        | [mg·kg <sup>-1</sup> ]                                  | [%]                  |
| Mg          | 285,208      | 0,0016                 | 1360  | 1414,4  | 104                  |
| P           | 213,617      | 0,0760                 | 2300  | 2231  | 97                   |
| Ca          | 317,933      | 0,0100                 | 21600   | 22896   | 106                  |
| Na          | 589,592      | 0,0690                 | 500   | 485   | 97                   |
| K           | 766,490      | -                      | 21000   | 19740   | 94                   |
| Cd          | 228,802      | 0,0027                 | 0,03  | 0,0315  | 105                  |

|    |         |        |       |        |        |
|----|---------|--------|-------|--------|--------|
| Cr | 267,707 | 0,0071 | 6,5   | 6,76   | 104    |
| Cu | 327,393 | 0,0097 | 9,4   | 10,058 | 107    |
| Fe | 238,204 | 0,0046 | 185   | 179,45 | 97     |
| Mn | 257,608 | 0,0014 | 47    | 46,53  | 99     |
| Ni | 231,604 | 0,0150 | 4     | 3,84   | 96     |
| Pb | 220,353 | 0,0420 | 1,6   | 1,696  | 106    |
| Zn | 206,200 | 0,0059 | 24    | 23,52  | 98     |
| S  | -       | 0,0250 | 25695 | 27023  | 105,68 |

Na podstawie przeprowadzonych analiz ustalono skład wytworzonych hydrolizatów, co przedstawiono w Tabeli 2.

Tab. 2. Skład chemiczny hydrolizatów wykorzystanych w badaniach.

| Parametr          | Hydrolizat |           | Jednostka                       |
|-------------------|------------|-----------|---------------------------------|
|                   | wariant 1  | wariant 2 |                                 |
| Sucha masa        | 12,80      | 12,80     | %                               |
| Węgiel organiczny | 26,00      | 23,00     | %                               |
| Potas             | 61,40      | 60,74     | g·kg <sup>-1</sup> suchej masy  |
| Fosfor            | 2,54       | 4,20      |                                 |
| Sód               | 5,36       | 2,98      |                                 |
| Wapń              | 0,31       | 0,31      |                                 |
| Magnez            | 0,55       | 0,85      |                                 |
| Siarka            | 82,82      | 83,59     |                                 |
| Żelazo            | 14,50      | 30,75     | mg·kg <sup>-1</sup> suchej masy |
| Miedź             | 2,07       | 2,20      |                                 |
| Cynk              | 8,95       | 62,66     |                                 |
| Chrom             | 0,26       | 0,35      |                                 |
| Ołów              | 0,71       | 0,68      |                                 |

|        |      |      |  |
|--------|------|------|--|
| Nikiel | 0,70 | 0,68 |  |
| Kadm   | 0,01 | 0,03 |  |
| Mangan | 1,23 | 1,83 |  |

### **Przykład 2. Badania efektywności wzrostu pszenicy i rzepaku**

Badania eksperymentalne dotyczące początkowego wzrostu pszenicy i rzepaku wykonywano stosując mikrobiotest PHYTOTOXKIT (MicroBioTests Inc., Gent, Belgium) tj. komercyjny zestaw zaprojektowany w celu testowania kiełkowania nasion i wczesnego wzrostu roślin dla określenia „bezpośredniego” (wewnętrznego) oddziaływania związków chemicznych w postaci płynnej na rośliny.

Analiza zasolenia hydrolizatów została przeprowadzona metodą konduktometryczną, gdzie przewodność elektrolityczna dla wariantu 1 wynosiła -  $84 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , zaś dla wariantu 2 wynosiła -  $87 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Ponieważ zasolenie cieczy wykorzystanej do traktowania roślin nie powinno przekraczać  $2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , bo powoduje to stres osmotyczny prowadzący do obniżenia turgoru komórek i naruszenia równowagi jonowej w roślinie wykonano rozcieńczenia hydrolizatów w proporcji objętościowej 1:200 (hydrolizat wariant 1 / wariant 2 : woda wodociągowa, v:v). Wykonana analiza rozcieńczonych hydrolizatów wykazała przewodność elektrolityczną dla wariantu 1 –  $0,77 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , zaś dla wariantu 2 –  $0,81 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Kontrolę stanowiła próba roślin traktowanych w PHYTOTOXKIT wodą wodociągową. W badaniu zastosowano 10 płytek PHYTOTOXKIT dla każdego traktowania (rozcieńczony hydrolizat 1 / rozcieńczony hydrolizat 2 / kontrola).

Rośliny po traktowaniu rozcieńczonymi hydrolizatami odpadu poprodukcyjnego (wariant 1 i wariant 2) w mikrobioteście PHYTOTOXKIT, jak i kontrolne przesadzono do doniczek wypełnionych glebą uniwersalną z dodatkiem perlitu (3:1, v:v). Doniczki umieszczono w fitotronie zapewniając optymalne warunki wzrostu dla roślin (wilgotność 60%, temperatura  $20^{\circ}\text{C}$ , natężenie światła  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  gęstości strumienia fotosyntetycznego fotonów generowane przez lampy sodowe AGRO Philips, fotoperiod 12 h światło / 12 h ciemność).

W fazie liści właściwych dokonano pomiarów wydajności fotosystemu II (PSII) stosując nieinwazyjną metodę pomiaru aktywności w roślinach fluorymetrem (Hansatech Instruments Ltd., Pentney, Wielka Brytania). Pomiar wydajności PSII

wykonywano po 20 minutowej adaptacji do ciemności. Na podstawie danych pomiarowych obliczono parametry podstawowe PSII wymienione w Tabeli 3.

Uzyskane dane pomiarowe oraz obliczone wyniki parametrów PSII dla traktowań i kontroli przedstawiono w Tabeli 3. Tabela 3 prezentuje wyniki badań wzrostu roślin w mikrobioteście PHYTOTOXKIT i parametry wydajności fotosystemu II (PSII) pszenicy i rzepaku traktowanych hydrolizatami odpadu poprodukcyjnego PHA (wariant 1 i wariant 2) oraz kontroli. Wartości przedstawione w tabeli są wartościami średnimi z 10 niezależnych powtórzeń. Odchylenie standardowe między próbkami nie przekraczało 25%, gdzie  $F_v/F_m$  oznacza maksymalną wydajność kwantową PSII, AREA oznacza całkowitą ilość akceptorów elektronów z PSII, P.I. oznacza ogólny indeks sprawności PSII, ABS/CS oznacza całkowitą absorpcję energii przez fragment liścia, TRo/CS oznacza przepływ energii pomiędzy centrum reakcji fotosyntetycznej PSII a akceptorem, ETo/CS oznacza przepływ energii przez akceptor, Dlo/CS oznacza ilość energii wzbudzenia rozpraszanej przez fragment liścia, RC/CS<sub>o</sub> oznacza zagęszczenie aktywnych centrów reakcji PSII w czasie, gdy mierzona jest minimalna wydajność fluorescencji, RC/CS<sub>m</sub> oznacza zagęszczenie aktywnych centrów reakcji PSII w czasie, gdy fluorescencja osiąga wartość maksymalną [15].

Tab. 3.

| Traktowanie     | Biometria roślin<br>PHYTOTOXKIT |  | Parametry PSII ocenione podczas wzrostu w doświadczeniu doniczkowym |       |      |        |        |        |        |                    |                    |
|-----------------|---------------------------------|--|---|-------|------|--------|--------|--------|--------|--------------------|--------------------|
|                 | długość<br>korzeni<br>[mm]      | długość<br>części<br>nadziemnych<br>[mm] | Fv/Fm   | Area  | P.I. | ABS/CS | TRo/CS | ETo/CS | Dlo/CS | RC/CS <sub>o</sub> | RC/CS <sub>m</sub> |
| <b>Pszenica</b> |                                 |  |   |       |      |        |        |        |        |                    |                    |
| Kontrola        | 58,39                           | 19,86                                    | 0,81  | 14333 | 2,29 | 186,33 | 152,91 | 83,53  | 33,42  | 83,53              | 465,75             |
| Wariant 1       | 66,97                           | 24,81                                    | 0,82  | 15257 | 2,76 | 198,83 | 161,50 | 86,89  | 37,43  | 90,42              | 480,99             |
| Wariant 2       | 60,27                           | 20,47                                    | 0,82  | 19040 | 2,48 | 202,20 | 165,41 | 92,55  | 36,79  | 97,11              | 533,83             |
| <b>Rzepak</b>   |                                 |  |   |       |      |        |        |        |        |                    |                    |
| Kontrola        | 66,49                           | 26,48                                    | 0,83  | 12400 | 2,09 | 182,07 | 152,27 | 66,61  | 29,80  | 93,38              | 572,12             |
| Wariant 1       | 68,15                           | 28,36                                    | 0,84  | 14680 | 2,54 | 186,13 | 156,16 | 74,95  | 28,97  | 95,80              | 596,39             |
| Wariant 2       | 70,55                           | 29,34                                    | 0,84  | 14507 | 2,17 | 194,07 | 162,17 | 73,30  | 31,89  | 99,13              | 603,47             |

Zastosowane w badaniu hydrolizaty odpadów wpływają na poprawę wzrostu korzeni i części nadziemnych pszenicy i rzepaku w porównaniu do kontroli w warunkach mikrobiotestu PHYTOTOKKIT. Poziom stymulacji wzrostu był zależny od zastosowanej rośliny testowej tj. pszenicy albo rzepaku oraz zastosowanego hydrolizatu tj. wariant 1 albo wariant 2. Najlepszą stymulację wzrostu uzyskano w przypadku pszenicy traktowanej rozcieńczonym hydrolizatem wariant 2 i było to 14% dla korzenia i 25% dla części nadziemnych w porównaniu do próby kontrolnej. Stymulacja dla pozostałych obiektów mieściła się w zakresie 2,5 – 11% w porównaniu do kontroli.

Zastosowane w badaniu hydrolizaty w wariacie 1 i wariacie 2 nie wpływają na obniżenie maksymalnej wydajności kwantowej PSII (parametr Fv/Fm) określanej też często, jako potencjalna w warunkach optymalnych wydajność kwantowa PSII, co świadczy o tym, że zastosowane hydrolizaty nie stanowią czynników stresowych dla badanych roślin.

Pszenica i rzepak traktowane hydrolizatami w wariacie 1 i wariacie 2 wykazały wyższe parametry AREA i P.I. w porównaniu do kontroli, co świadczy o lepszym funkcjonowaniu fazy ciemnej fotosyntezy.

Zastosowane w badaniu hydrolizaty w wariacie 1 i wariacie 2 istotnie wpływają na poprawę parametrów P.I., RC/CSo i RC/CSm w porównaniu do kontroli, co świadczy o większym zagęszczeniu aktywnych centrów reakcji PSII i lepszej ich witalności tj. wyższej sprawności aparatu fotosyntetycznego w porównaniu do roślin kontrolnych.

Jedynym parametrem PSII, dla którego wykazano nieznaczne ograniczenie w porównaniu do kontroli była ilość energii wzbudzenia rozpraszanej przez fragment liścia (Dlo/CS) w przypadku rzepaku traktowanego hydrolizatem w wariacie 1, przy czym wszystkie pozostałe parametry były istotnie wyższe, w tym ogólny indeks sprawności PSII (P.I.), co należy traktować nie jako przejaw uszkodzeń PSII, lecz możliwą zmianę adaptacyjną.

### **Przykład 3. Badania wzrostu stężenia fitohormonów**

Fitohormony takie jak kwas indoliloctowy (IAA), kwas abscysynowy (ABA), kwas salicylowy (SA) oraz kwas jasmonowy (JA) są odpowiedzialne za prawidłowy wzrost i odporność roślin.

Po zakończeniu wzrostu w przeprowadzonym doświadczeniu w doniczkach, z roślin pobrano fragmenty korzeni i części nadziemnych roślin traktowanych rozcieńczonymi

hydrolizatami w wariancie 1 i wariancie 2 oraz kontrolnych (rośliny nietraktowane hydrolizatem), które podlegały głębokiemu mrożeniu w azocie, a następnie dokonano oceny zawartości fitohormonów.

Próbki roślinne o znanej masie po zamrożeniu w ciekłym azocie poddano liofilizacji. IAA, ABA, SA oraz JA oznaczono w korzeniach i częściach nadziemnych rzepaku i pszenicy według metodyki opisanej przez Grzyb i in. [16]. Zgodnie z metodyką, zliofilizowane próbki homogenizowano w mieszaninie metanolu, wody i kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym 15:4:1. Do mieszaniny dodano deuterowanego standardu wewnętrznego (Phytohormone standards, Olchemim, Czechy) zawierającego badane fitohormony (jego dodatek pozwala na skorygowanie strat analitów podczas procedury przygotowywania próbek do analizy oraz na uniezależnienie otrzymywanych wyników od wahań ilości dozowanej próbki), po czym próbki poddano oczyszczaniu na kolumnkach SPE (Bond Elut Plexa PCX, 30 mg, 1 mm, Agilent, Santa Clara, CA, USA), gdzie faza ruchoma zawierała 0,1% roztwór kwasu mrówkowego (rozpuszczalnik A) i mieszaninę acetonitryl:metanol w stosunku objętościowym 1:1 (rozpuszczalnik B). Próbki analizowano za pomocą systemu UHPLC Agilent 1260 połączonego ze spektrometrem masowym 6420 ESI Tandem z kolumną Supelco Ascentis RP-Amide (7,5 cm × 4,6 mm, 2,7 μm) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Zawartość badanych fitohormonów w pszenicy i rzepaku przedstawiono w Tab. 4 (korzenie) i Tab. 5 (części nadziemne).

Tab. 4. Stężenie fitohormonów w korzeniach pszenicy i rzepaku ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  świeżej masy). Średnia z trzech niezależnych powtórzeń. Odchylenie standardowe między próbkami nie przekraczało 25%.

| <b>Traktowanie</b> | <b>Kwas indoliloctowy (IAA)</b> | <b>Kwas abscysynowy (ABA)</b> | <b>Kwas salicylowy (SA)</b> | <b>Kwas jasmonowy (JA)</b> |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>Pszenica</b>    |                                 |                               |                             |                            |
| Kontrola           | 249,84                          | 16,71                         | 219,45                      | 116,54                     |
| Wariant 1          | 277,33                          | 15,65                         | 130,19                      | 28,30                      |
| Wariant 2          | 282,05                          | 12,68                         | 106,88                      | 49,84                      |

| <b>Rzepak</b> |        |        |         |        |
|---------------|--------|--------|---------|--------|
| Kontrola      | 435,34 | 665,98 | 3280,54 | 396,97 |
| Wariant 1     | 530,23 | 400,07 | 3297,83 | 241,28 |
| Wariant 2     | 514,18 | 200,41 | 2452,06 | 149,37 |

Tab. 5. Stężenie fitohormonów w częściach nadziemnych pszenicy i rzepaku ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$  świeżej masy). Wartość przedstawiona w tabeli stanowi średnią z trzech niezależnych powtórzeń. Odchylenie standardowe między próbkami nie przekraczało 25%.

| <b>Traktowanie</b> | <b>Kwas indoliloctowy (IAA)</b> | <b>Kwas abscysynowy (ABA)</b> | <b>Kwas salicylowy (SA)</b> | <b>Kwas jasmonowy (JA)</b> |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>Pszenica</b>    |                                 |                               |                             |                            |
| Kontrola           | 96,62                           | 62,26                         | 385,25                      | 72,84                      |
| Wariant 1          | 127,06                          | 38,73                         | 374,30                      | 39,04                      |
| Wariant 2          | 131,55                          | 43,32                         | 241,39                      | 36,67                      |
| <b>Rzepak</b>      |                                 |                               |                             |                            |
| Kontrola           | 140,41                          | 94,93                         | 535,13                      | 25,01                      |
| Wariant 1          | 175,06                          | 38,66                         | 430,70                      | 24,31                      |
| Wariant 2          | 164,03                          | 44,25                         | 458,86                      | 22,51                      |

Stężenie IAA w korzeniach pszenicy zwiększyło się o około 11 % dla wariantu 1 i około 13 % dla wariantu 2, natomiast w korzeniach rzepaku zaobserwowano zwiększenie stężenia IAA o około 22 % i 18 % dla wariantu 1 i 2 odpowiednio. W częściach nadziemnych wzrost stężenia IAA dla pszenicy wyniósł około 36 % i 32 % oraz dla rzepaku około 17 % i 25 % dla wariantu 1 i 2 odpowiednio. Zwiększenie stężenia IAA w korzeniach i częściach nadziemnych badanych roślin w porównaniu do kontroli może świadczyć o stymulacji kiełkowania nasion i wzrostu siewek po zastosowaniu hydrolizatów.

ABA, SA i JA to najbardziej znane elicytory, odpowiedzialne za odpowiedź stresową roślin. W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano spadek ich stężenia w korzeniach i częściach nadziemnych badanych roślin po zastosowaniu obu hydrolizatów, co świadczy o braku ich negatywnego wpływu na kiełkowanie i wzrost siewek. W korzeniach pszenicy dla wariantu 1 zaobserwowano zmniejszenie stężenia ABA, SA i JA o około 6 %, 41 % i 76 %, natomiast dla wariantu 2 zmniejszenie ich stężenia odpowiednio o 24 %, 51 % i 57 %. W częściach nadziemnych pszenicy dla wariantu 1 zaobserwowano zmniejszenie stężenia ABA, SA i JA o około 38 %, 3 % i 46 %, natomiast dla wariantu 2 zmniejszenie ich stężenia odpowiednio o 30 %, 37 % i 50 %.

W korzeniach rzepaku stężenie ABA, SA i JA zmniejszyło się około 40 %, 0,5 %, 39 % oraz o 70 %, 25 % i 63 % dla wariantu 1 i 2 odpowiednio. W częściach nadziemnych rzepaku zaobserwowano zmniejszenie stężenia ABA, SA i JA dla wariantu 1 o około 59 %, 20 % i 3 %, zaś dla wariantu 2 o 53 %, 14 % i 10 %.

Zmniejszenie ABA w korzeniach badanych roślin miało wpływ na przyspieszenie kiełkowania roślin, co z kolei mogło być związane (tak samo jak w przypadku wzrostu stężenia IAA) z wydłużeniem korzeni i części nadziemnych (wyniki z Przykładu 2).

#### Literatura:

1. Saito, K., Six, J., Komatsu, S., Snapp, S., Rosenstock, T., Arouna, A., Cole, S., Taulya, G., Vanlauwe, B. (2021). Agronomic gain: Definition, approach, and application. *Field Crops Res.* 270, 108193.
2. Shahmohamadloo, R. S., Febria, C. M., Fraser, E. D. G., Sibley, P. K. (2022). The sustainable agriculture imperative: A perspective on the need for an agrosystem approach to meet the United Nations Sustainable Development Goals by 2030. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 18(5), 1199–1205.
3. Kopittke, P. M., Menzies, N. W., Wang, P., McKenna, B. A., Lombi, E. (2019). Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environ. Int.* 132, 105078.
4. Certini, G., Scalenghe, R. (2023). The crucial interactions between climate and soil. *Sci. Total Environ.* 856(Pt 2), 159169.

5. Hilty, J., Muller, B., Pantin, F., Leuzinger, S. (2021). Plant growth: the What, the How, and the Why. *New Phytol.* 232(1), 25–41.
6. Bhupenchandra, I., Chongtham, S.K., Devi, E.L., Ramesh, R., Choudhary, A.K., Salam, M.D., Sahoo, M.R., Bhutia, T.L., Devi, S.H., Thounaojam, A.S., Behera, C., Harish, M.N., Kumar, A., Dasgupta, M., Devi, Y.P., Singh, D., Bhagowati, S., Devi, C.P., Singh, H.R., Khaba, C.I. (2022). Role of biostimulants in mitigating the effects of climate change on crop performance. *Front. Plant Sci.* 13, 1–19.
7. du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3-14.
8. Ma, Y., Freitas, H., Dias, M. C. (2022). Strategies and prospects for biostimulants to alleviate abiotic stress in plants. *Front. Plant Sci.* 13, 1024243.
9. Daniel , A.I., Fadaka, A.O., Gokul, A., Bakare, O.O., Aina, O., Fisher, S., Burt, A.F., Mavumengwana, V., Keyster, M., Klein, A. (2022). Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety. *Microorganisms.* 10, 1220.
10. Gorczyca Anna: Bioprodukty w rolnictwie, w: Biogospodarka. Wybrane aspekty / Pink Małgorzata, Wojnarowska Magdalena (red. ), 2020, ISBN 978-83-8085-291-4, ss. 220-284, Numer artykułu: 7.
11. Rosenboom, J. G., Langer, R., Traverso, G. (2022). Bioplastics for a circular economy. *Nature reviews. Materials,* 7(2), 117–137.
12. Dietrich K., Dumont M-J., Del Rio L.F., Orsat V. (2017). Producing PHAs in the bioeconomy - Towards a sustainable bioplastic. *Sustain. Prod. Consum.* 9, 58-70.
13. Jõgi K., Bhat R. (2020). Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production. *Sustain. Chem. Pharm.* 18:100326.
14. Penuelas, J., Coello, F. Sardans, J. (2023) A better use of fertilizers is needed for global food security and environmental sustainability. *Agric. & Food Secur.* 12, 5.
15. Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U and Mohanty P (red.) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, pp 445-483. Taylor and Francis, London
16. Grzyb, M., Kalandyk, A., Waligórski, P., Mięka, A. (2017). The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 129, 387–397.