

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 399

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01N 25/22 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01N 63/30 (2020.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-661**
(22) Přihlášeno: **16.10.2017**
(40) Zveřejněno: **09.05.2019**
(Věstník č. 19/2019)
(47) Uděleno: **17.06.2020**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **29.07.2020**
(Věstník č. 31/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
IKEDA S. et al.: „Biocontrol of black scurf on potato by seed tuber treatment with *Pythium oligandrum*“, Biological Control, vol. 60, no. 3, 2012, str. 297 - 304, ISSN 1049-9644; CLIQUET S. et al.: „Development of a defined medium for *Pythium oligandrum* oospore production“, Biocontrol Science and Technology, vol. 12, no. 4, 2002, str. 455 - 467, ISSN 0968-3157.
CZ 302 297; JP 2010 143 876; CZ 303 908.

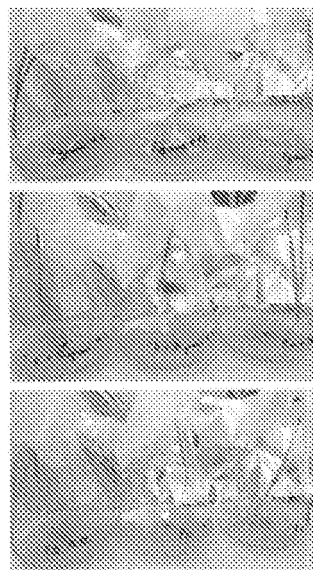
(73) Majitel patentu:
BIOPREPARÁTY, spol. s r.o., Praha 6, Dejvice,
CZ

(72) Původce:
Ing. arch. Martin Suchánek, Praha 6, CZ
Bc. Jan Moravec, Statenice, CZ
Ing. Tomáš Vaněk, Praha 5, CZ
Adam Štípek, Louny 1, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Marie Smrčková, patentový zástupce,
Velflíkova 10, 160 00 Praha 6

(54) Název vynálezu:
**Biologický protiplísňový kapalný prostředek
s mikroorganismem *Pythium oligandrum* a
způsob jeho výroby**

(57) Anotace:
Biologický protiplísňový kapalný prostředek s mikroorganismem *Pythium oligandrum*, zahrnující stabilizovanou suspenzi mikroorganismu *Pythium oligandrum*, který obsahuje 0,05 až 10,0 % hmotn. kultivační biomasy mikroorganismu *Pythium oligandrum* s obsahem kultivačního média, buněčných forem tohoto mikroorganismu a látek produkovaných tímto mikroorganismem; a 90,0 až 99,95 % hmotn. stabilizátoru, kterým je alespoň jedna komponenta ze skupiny, zahrnující vodu, solný roztok, olej, roztoky osmolytů a glycerol, přičemž v 1 ml tohoto biologického protiplísňového kapalného prostředku je, po běžné standardizaci, předem požadovaný počet dormantních oospor v rozsahu 1×10^3 až 2×10^7 . Je nárokován způsob výroby tohoto biologického protiplísňového kapalného prostředku.



CZ 308399 B6

Biologický protiplísňový kapalný prostředek s mikroorganismem *Pythium oligandrum* a způsob jeho výroby

5 Oblast techniky

Vynález se týká biologického protiplísňového kapalného prostředku s mikroorganismem *Pythium oligandrum* s dlouhodobou stabilitou v řádu měsíců. Vynález se též týká způsobu výroby tohoto přípravku.

10

Dosavadní stav techniky

Chemické protiplísňové prostředky vzbuzují v posledních desetiletích vzrůstající obavy z
15 hlediska negativního vlivu na životní prostředí i na samotného spotřebitele. Nicméně je možné konstatovat, že jejich nahrazení účinnými biologickými prostředky založenými na mikrobech schopných likvidovat plísně cíleným a šetrným způsobem zatím neproběhlo v žádoucím rozsahu. V zemích EU je pro tento účel nyní registrováno pouze 14 mikrobiálních druhů i přes velmi intenzivně probíhající výzkum, jak zdůrazňuje nedávný přehledný článek Gerbore a spol. z roku
20 2014 [1].

Praktická aplikace biologického prostředku využívajícího protiplísňové účinky mikroorganismu *Pythium oligandrum* je známá již od 70. let minulého století s odkazem na klasické práce
25 Dreschlera [2] z r. 1943 a Deacona [3] z r. 1976 věnované biologii tohoto mikroorganismu a popisující jeho mykoparazitické vlastnosti. Z tohoto období pochází mj. patent US 4259317 [4] dvojice autorů Veselý a Hejdánek s prioritním datem 5. 7. 1978, věnovaný suchým práškovým přípravkům s obsahem oospor *Pythium oligandrum* Drechsler pro ochranu před plísňovými chorobami vzcházejících výhonků řepy cukrové s obsahem oospor nejméně 1 milion oospor na g přípravku, přičemž jako optimální rozsah je uváděno množství mezi 50 až 500 miliony oospor na
30 g přípravku. Autoři tohoto vynálezu připouštějí jako použitelnou alternativu k suchým práškovým přípravkům i kapalně suspenze oospor, pro jimi připravenou aplikační formu však uvádějí řadu nevýhod, zejména nestabilitu takových přípravků limitující jejich praktickou použitelnost na cca 2 týdny. Po delší době dochází k nepřijatelnému snížení vzcházejivosti oospor, která je nezbytná pro uplatnění mykoparazitického mechanismu ochrany, v důsledku autolýzy
35 nebo kontaminace hyperparazity. Pokud jde o zdroje jednotlivých kmenů *Pythium oligandrum*, upozornili autoři Baker a Lifshitz ve svém patentu US 4574083 [5] na možnost získání regionálně vhodných kmenů izolací z půdy podle standardní publikované metodiky. Tento postup se mezitím osvědčil a ve veřejných sbírkách tak jsou k dispozici kmeny z různých geografických lokalit. Pro identifikaci izolátů byla v té době aplikována převážně biologická kritéria: rychlost
40 růstu, optimální teplota růstu – bývá kolem 30 °C, a morfologie jednotlivých reprodukčních forem sexuálního i asexuálního cyklu. Z tohoto pohledu je jako průlomový možno označit následný patent, v němž vynálezce Martin US 5961971 [6] zavádí molekulární charakterizaci jednotlivých izolátů na základě přesného sekvenčního protokolu kritických genů. V téže patentovém dokumentu jsou detailně uváděny též jednotlivé formulace a způsoby aplikace
45 mikroorganismu *Pythium oligandrum* v polních podmínkách, přičemž jako preferované formulace jsou zmiňovány jednak kapalná formulace po nárůstu na levných médiích založených na průmyslových odpadních surovinách a jednak prášková formulace připravená enkapsulací biomasy vysušené po fermentaci do alginátů nebo ve formě vysušeného a rozemletého produktu. Mezi dalšími možnými formulacemi je ještě uváděna formulace ve formě smáčitelných prášků,
50 běžných prášků, emulgovaných olejů a granulí. Patent CZ 303908 a korespondující EP 2503892 [7] společnosti BIOPREPARÁTY, spol. s r.o. z roku 2009 je zaměřený na posklizňovou ochranu plodin s použitím mikroorganismu *Pythium oligandrum*. Ve své technologické části se zaměřuje na kultivaci tohoto mikroorganismu v běžných fermentorech na kapalných médiích s obsahem obilovin bez přídavku dalších výživných látek. Akcentována je možnost získání čistého
55 koncentráту oospor bez přítomnosti vyčerpaného média nebo zbytků mycelia, které jsou odstraněny během sušení ve sprejové sušárně v pozdních fázích výrobního procesu. V omezené

miře byly publikovány poznatky s přípravou oospor jiných organismů než *Pythium oligandrum*. V patentové přihlášce CN 102807957 A [8] Liu X. a spol. z roku 2012 je popsána příprava vzcházejících oospor mikroorganismu *Phytophthora capsici* pro sledování rezistence vůči různým léčivům a pro genetický výzkum. Kapalně přípravky pro biologickou ochranu rostlin jsou uváděny v patentové přihlášce US 2014/0212387 [9] Lüth z roku 2014, přičemž se však jedná výlučně o kapalně prostředky s využitím polyethoxy modifikovaných trisiloxanů jako solventů.

Příprava a stabilizace oospor a jiných reprodukčních forem mikroskopické řasovky *Pythium oligandrum* je dále diskutována do určité míry v nepatentové literatuře. McQuilken a spol. [10] publikoval v roce 1990 jednoduchou a reprodukovatelnou metodu přípravy oospor v kapalně kultuře s použitím melasy jako ekonomicky nenáročného substrátu. Otázka ideálního způsobu uchování připravených oospor není však v patentové ani nepatentové literatuře uspokojivě vyřešena. McQuilken a spol. [11] z roku 1992 sledovali vliv různých osmotik jako je glycerol, NaCl a KCl na rychlost radiální extenze hyf a vzcházivost oospor řasovky *Pythium oligandrum* srovnáním s osmotickým tlakem představovaným extraktem půdy ve výši $-0,5$ MPa. Přídavek osmolytů snižoval rychlost radiální extenze, ale neměl vliv na vzcházivost až do hodnoty cca $-2,0$ MPa. Autoři uzavírají, že lze předpokládat dobrou účinnost aplikovaných oospor za běžně se vyskytujících osmotických podmínek v místech aplikace za předpokladu, že jsou též splněny podmínky z hlediska optimální teploty, zpravidla 30 °C, a kyselosti pH $6,0$ až $7,5$. Z hlediska skladovatelnosti získaných oospor je zmiňována autory Takenaka a Ishikawa [12] z roku 2013 jejich vysoká účinnost po dobu až 379 dní při uchování běžně připravené suspenze v destilované vodě v lednici při 4 °C.

Jako hlavní překážka pro větší rozšíření biologických ochranných prostředků je odborníky jasně uváděna zejména závislost účinnosti na konkrétních podmínkách aplikace a praktické problémy s udržováním a přípravou biologických přípravků na ochranu rostlin v každodenní zemědělské praxi. Proto je vyřešení praktických problémů spojených s jednoduchým a účinným skladováním a aplikací oospor *Pythium oligandrum* pro obchodní úspěch biologických přípravků kritické. Pro vyřešení tohoto problému by bylo žádoucí vyvinout prostředky biologické ochrany v kapalném stavu s vysokou dlouhodobou stabilitou i za podmínek běžného skladování. Dosud publikovaná řešení však trpí řadou nevýhod, které se nepodařilo ani po letech intenzivního úsilí odstranit. Většina postupů laboratorní přípravy biologických přípravků na ochranu rostlin je složitá a zvládnutelná jen v laboratorním měřítku, což silně omezuje použití těchto postupů pro průmyslovou výrobu. Dosud preferovaný způsob aplikace ve formě smáčitelných prášků, který byl uplatněn u celosvětově prodávaných přípravků produkovaných českou biotechnologickou firmou Biopreparáty, spol.s.r.o. (Polyversum[®], Polygandron, BIOREPEL[®]), není bez komplikací z pohledu cílení ochranného zásahu i ochrany uživatelů. Doposud nebyl publikován jednoduchý, dobře vyzkoušený a konzistentně definovaný postup vhodný pro formulaci s dostatečnou skladovatelností připravených reprodukčních forem mikroorganismu *Pythium oligandrum*, zejména oospor, v jednoduché a průmyslově snadno využitelné podobě.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody dosud uplatňovaných řešení protiplísňových biologických přípravků se odstraní nebo omezí podle tohoto vynálezu, jehož podstatou je biologický protiplísňový kapalně prostředek s mikroorganismem *Pythium oligandrum* podle nezávislého nároku 1, zahrnující stabilizovanou suspenzi *Pythium oligandrum*, který obsahuje: $0,05$ až $10,0$ % hmotn. kultivační biomasy mikroorganismu *Pythium oligandrum* s obsahem kultivačního média, buněčných forem tohoto mikroorganismu a látek produkovaných tímto mikroorganismem; a $90,0$ až $99,95$ % hmotn. stabilizátoru, kterým je alespoň jedna komponenta ze skupiny, zahrnující vodu, solný roztok, olej, roztoky osmolytů a glycerol; přičemž v 1 ml tohoto biologického protiplísňového kapalně prostředku je, po běžné standardizaci, předem požadovaný počet dormantních oospor v rozsahu 1×10^3 až 2×10^7 .

Biologický protiplísňový kapalný prostředek s mikroorganismem *Pythium oligandrum*, podle tohoto vynálezu také zahrnuje stabilizovanou suspenzi mikroorganismu *Pythium oligandrum*, která obsahuje: 0,05 až 10,0 % hmotn. kultivační biomasy mikroorganismu *Pythium oligandrum* s obsahem kultivačního média, buněčných forem tohoto mikroorganismu a látek produkovaných tímto mikroorganismem, 79,77 až 99,95 % hmotn. stabilizátoru, kterým je alespoň jedna komponenta ze skupiny, zahrnující vodu, solný roztok, olej, roztoky osmolytů a glycerol; a případně zbytek do 100 % hmotn. nejméně jedné běžné modifikující/aplikační látky ze skupiny, zahrnující plnidlo, aroma, vitamin E; přičemž v 1 ml tohoto biologického protiplísňového kapalného prostředku je, po běžné standardizaci, předem požadovaný počet dormantních oospor v rozsahu $2,5 \times 10^4$ až $1,0 \times 10^6$.

S výhodou je mikroorganismem *Pythium oligandrum* kmen *Pythium oligandrum* Drechsler ATTC 38472, který byl deponován v České sbírce mikroorganismů (CCM) Masarykova Univerzita v Brně pod označením *Pythium oligandrum* M1.

Hlavní výhodou tohoto vynálezu je získání nového biologického protiplísňového kapalného prostředku, vhodného pro dlouhodobé použití, a dosažení jeho dlouhodobého a významného stabilizačního účinku, přičemž použité stabilizátory jsou cenově dostupné a poskytují další výhodu při ochraně obsažené biomasy mikroorganismu *Pythium oligandrum* před mikrobiální kontaminací. Nárokováný obsah dormantních buněk výše uvedeného mikroorganismu ve formě oospor poskytuje prakticky vyzkoušený a ekonomicky výhodný rozsah, umožňující snadné dávkování pro široký rozsah potřebných aplikací. Mohou se použít různé druhy biomasy, které se zpracují vhodnou přípravou. Nižší koncentrace dormantních oospor, např. v počtu desítek nebo stovek dormantních oospor přináší též výsledky, ale účinnost tohoto prostředku je nižší. Předem stanovený počet dormantních oospor se může upravovat v případě potřeby běžnou standardizací, tj. zředěním, nebo koncentrováním na požadovanou hodnotu.

Je výhodné, když stabilizátor obsahuje alespoň jednu komponentu ze skupiny, zahrnující vodu, solný roztok, oleje nebo roztoky osmolytů, což mohou být roztoky polyolů, typu sacharidů nebo sacharidových alkoholů nebo roztoky solí. Roztoky polyolů mohou být vybrány ze skupiny, zahrnující metabolizovatelné nebo nemetabolizovatelné roztoky různých oligosacharidů, obsahujících maximálně 10 sacharidových jednotek a minimálně 2 sacharidové jednotky, jako je maltodekaosa nebo maltonaosa nebo maltoooktaosa nebo maltoheptaosa nebo maltohexaosa nebo maltopentaosa nebo stachyosa nebo rafinosa nebo sacharóza nebo sukralosa, popřípadě mohou být použité sacharidy větvené.

Ve výhodném provedení je stabilizátorem voda v množství např. 30,0, až 99,9 % hmotn., nebo solný roztok v množství např. 99,9 % hmotn., nebo osmolyt ve formě sacharózy v množství např. 60,0 až 64,95 % hmotn., nebo alespoň jeden olej vybraný ze skupiny zahrnující parafinový olej, minerální olej, slunečnicový olej v množství např. 79,77 až 99,9 % hmotn.

Biologický protiplísňový kapalný prostředek může obsahovat další modifikující nebo aplikační látky pro dané specifické použití jako např. postupně se uvolňující biodegradovatelnou matici jakožto nosič oospor mikroorganismu *Pythium oligandrum*, jako je polyvinylalkohol, v množství např. 16,0 % hmotn.; nebo plnidlo na bázi oxidu křemičitého, v množství např. 16,0 % hmotn.; případně další aplikační/modifikující látky, jako je šalvějové nebo mátové aroma, v množství např. 0,96 % hmotn., nebo vitamin E v množství např. 0,4 % hmotn.

Použití těchto aplikačních/modifikujících látek se odvíjí podle aplikací biologického protiplísňového prostředku.

Tudíž, stabilizovaná suspenze oospor mikroorganismu *Pythium oligandrum* může využít široký rozsah stabilizujících činidel hydrofilní i hydrofobní povahy jako je obyčejná voda nebo olej nebo roztoky různých cenově nenáročných osmolytů.

Osmolyty je možné jejich chemickou povahou ideálně přizpůsobit na míru potřebným aplikacím, neboť se ukázalo, že osmolyty mohou být jak iontové povahy, jako jsou roztoky různých solí, tak i neiontové povahy, jako jsou roztoky polyolů. Skutečnost, že polyoly mohou být představovány například metabolizovatelnými nebo nemetabolizovatelnými roztoky různých definovaných oligosacharidů, je pro řadu aplikací výhodná, protože mohou být k tomuto účelu použity směsi vhodných přírodních stejně jako syntetických látek požadovaných vlastností. S výhodou mohou přitom být použity i běžně dostupné látky jako je sacharóza, ale pokud je to vyžadováno, mohou být použity i běžně dostupná nemetabolizovatelná analoga. Kompozice kapalných suspenzí je kompatibilní s širokou škálou dalších látek modifikujících jejich užité vlastnosti nebo jejich aplikaci ve formě protioxidačních látek, přirozených aktivátorů a vitamínů, jako je například oxid křemičitý jakožto plnidlo, vitamin E acétát a jiné látky.

Překvapivě bylo zjištěno, že pokud je buněčný podíl vzniklý pevnou nebo kapalnou kultivací po skončení přípravy přímo upraven do formy suspenze, suspenze reprodukční formy mikroorganismu *Pythium oligandrum* si uchovají v takové teplotě. Tento výsledek přitom vystupuje do popředí o to více, pokud zvážíme nereprodukované a variabilní výsledky uváděné v publikované literatuře. V literatuře se například uvádí, že suspenze oospor připravená v destilované vodě a skladovaná po dobu 188 nebo 384 dní si uchovávala původní vzcházivost při skladování v lednici při 4 °C. Nicméně zcela chybějící popis způsobu přípravy takto popisovaných preparátů činí téměř nemožné vyhodnotit jejich vědeckou platnost, nemluvě již o praktické použitelnosti, kdy za provozních podmínek na farmách nemusí být skladovací teplota 4 °C dokonce ani k dispozici.

Biologický protiplísňový kapalný prostředek s mikroorganismem *Pythium oligandrum* se získá způsobem výroby podle tohoto vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že při aerobní kultivaci oomycety *Pythium oligandrum* v kapalně fázi se kapalně médium obsahující extrakt z obilovin, třtinovou melasu a další nezbytné živiny sterilizuje v parním sterilizátoru. Po vychladnutí se zaočkuje jedním z vybraných kmenů *Pythium oligandrum*. Po skončení kultivace, v řádu několika dní s výhodou 13 dní, se biomasa sklídí a zpracuje. Po ukončení kultivační fáze *Pythium oligandrum* v kapalně fázi se biomasa s kapalným médiem homogenizuje, aby minimálně 95 % částic v suspenzi bylo v rozmezí 0,050 až 0,300 mm, s výhodou 0,125 mm. Homogenní suspenze charakterizovaná počtem oospor se podle počtu oospor suspenze koncentruje nebo zředí na předem požadovanou koncentraci oospor v biologickém protiplísňovém prostředí. S výhodou se po fázi homogenizace a koncentrování nebo ředění suspenze filtruje.

Vodná suspenze se při homogenizaci stabilizuje přidavkem osmolytů a v kombinaci s uchováváním při teplotách nižších než 8 °C se skladuje ve sterilních velkoobjemových nádobách.

V případě bezvodé suspenze mikroorganismu *Pythium oligandrum* se po ukončení kultivační fáze na pevném substrátu nebo v kapalně fázi získaný materiál homogenizuje až do dosažení velikosti minimálně 95 % částic v suspenzi v rozmezí 0,050 až 0,300 mm, s výhodou 0,125 mm. Získaná homogenní suspenze charakterizovaná počtem oospor se odstředí. Odstředěný materiál se po odstranění supernatantu doplní olejem na předem požadovanou koncentraci oospor pro výrobu biologického protiplísňového prostředku v takovém množství, aby výsledná koncentrace oospor v biologickém protiplísňovém prostředí a takto získaný materiál se následně resuspenduje homogenizací.

Předkládané řešení se jeví být výhodné i z pohledu významného zjednodušení biotechnologického procesu přípravy mikroorganismu *Pythium oligandrum* a tím též významného snížení provozních nákladů výrobců takových přípravků. Filtrace nebo separace kultivované biomasy od produkčního média, její sušení a následné mletí na požadovanou velikost částic představuje několik procesů zpracování, které jsou energeticky a technologicky poměrně náročné, obtížně kontrolovatelné, náchylné k možnosti vzniku kontaminací a mohou konečně významně poškodit výsledný produkt, pokud nejsou prováděny za přesně definovaných a průmyslově vysoce náročných podmínek. Naopak technologicky velmi jednoduchým suspendováním získané biomasy v hustých a viskózních roztocích osmolytů se získá velmi

stabilní výsledný produkt okamžitě vhodný pro řadu praktických aplikací. Z praktického hlediska představuje nezanedbatelnou výhodu, že připravené suspenze mikroorganismu *Pythium oligandrum* je možné téměř kvantitativně přenést z kultivačních nádob nebo fermentorů, což minimalizuje náklady na jejich čištění a údržbu a zároveň minimalizuje i množnost úniku produktu do pracovního prostředí výrobního provozu. Také samotný fakt, že takto získaný produkt je dlouhodobě stabilní i při skladování v běžných teplotách též významně snižuje provozní náklady a usnadňuje manipulaci s produktem.

Překvapivě bylo navíc zjištěno, že kromě stabilizačních efektů koncentrovaných roztoků osmolytů se v konkrétním případě námi zkoumaných suspenzí oospor mikroskopické řasovky *Pythium oligandrum* významně uplatňuje i konzervační účinek takových roztoků, který je z výrobní i běžné praxe dobře známý. Takto skladovaný produkt je proto chráněn před kontaminací nežádoucími mikroorganismy, které dokonce i v případě velmi nepravděpodobného vniknutí do takto stabilizovaných suspenzí se nemohou v navrhovaném chemickém prostředí rozmnožovat a nemohou proto kontaminovat výsledný produkt. Tato výhoda je v současné výrobní praxi zásadní povahy zejména ve světle stále se zpřísňujících požadavků na úroveň náhodné kontaminace u pesticidních, biocidních a kosmetických produktů.

Kromě úlohy stabilizátoru a úlohy konzervační látky mohou roztoky osmolytů též plnit úlohu adheziva, která se může prakticky uplatnit při mnoha aplikacích, ať již ve formě vodných roztoků po naředění stabilizovaných suspenzí oospor na optimální koncentraci s aplikací namáčením, nebo pro aplikaci jemným rozptýlením mikroskopických částic (tzv. mlžení). Ve všech shora uvedených příkladech aplikací tedy napomáhají roztoky polyolů k účinné adhezi a následně rovnoměrné aplikaci na ošetřených místech, rostlinách nebo plodinách.

V neposlední řadě je potom třeba zmínit, že v případě použití metabolizovatelných osmolytů mohou přímo na místech aplikace sloužit tyto látky jako živina důležitá při kolonizaci a osídlení cílových míst, přičemž jde o významnou živinu zejména v první fázi spojené s přechodem oospor do mycelární formy. Následně mohou převzít úlohu živin důležitých pro dlouhodobý růst a udržení mikroskopické řasovky *Pythium oligandrum* na místě aplikace živiny více komplexní povahy představované nedokonale fermentovaným substrátem použitým při biotechnologickém růstu a namnožení oospor během biotechnologické kultivace.

Měrný obsah oospor a dalších reprodukčních forem mikroskopické řasovky v suspenzích podle předkládaného řešení je srovnatelný nebo vyšší s dříve zkoušenými a prodávanými sytkými přípravky, což je důležité z pohledu logistiky a ekonomiky distribuce takto vyráběného produktu. Nové formulace však umožňují i použití nižších koncentrací oproti předcházejícím řešením.

V návaznosti na použitý technologický postup došlo u nového kapalného protiplísňového prostředku podle tohoto vynálezu k faktické významné redukci kompoziční komplexity, aniž by toto bylo spojeno s jakýmkoliv omezením funkce, resp. účinnosti takto formulovaného kapalného přípravku. Pokud jde o buněčnou a partikulární složku nově navrhovaného přípravku, je tato téměř výlučně představována stabilizovanými oosporami s velmi malým podílem myceliálních fragmentů, rozemletého prosa a jiných komponent. Tyto komponenty ovšem v hustém prostředí tvořeném koncentrovanými osmoly vůbec nesedimentují, což překvapivě zaručuje dobrou homogenitu přípravku, nesrovnatelně lepší, než je tomu u smáčitelných prášků aplikovaných ve formě vodných suspenzí, kdy se jednalo o preparát velmi heterogenní z hlediska velikosti obsažených částic. Zejména se toto týká částic oxidu křemičitého obsaženého v doposud vyráběných přípravcích, v řešení podle předkládaného vynálezu naopak oxid křemičitý u většiny příkladů chybí (s výjimkou zubní pasty, kde je použit jako abrasivum). Z hlediska potřeb praktických aplikací tudíž nyní nedochází k ucpávání filtrů a jiných technologických zařízení během aplikace přípravku.

Pokud by pro určité aplikace byla na závadu přítomnost menších množství metabolizovatelných osmolytů, je tyto možné snadno nahradit bez jakéhokoliv ovlivnění nejdůležitějších vlastností přípravku chemicky blízkými nemetabolizovatelnými osmolyty.

V případě, že by bylo technologicky vhodnější získaný produkt vysušit, nabízela by se jako vhodná technologie mrazové sublimace (lyofilizace) v přístrojích s vysokou hodnotou vakua, neboť použití koncentrovaných roztoků osmolytů jako kryopreservantů a ochranných látek při lyofilizaci je dobře známé a široce využíváno. Jako příklad je možné uvést osmolyty široce využívány jako ochranné kryopreservanty v řadě citlivých aplikací včetně kryopreservace lidských oocytů popsané například v přehledném článku Wright [15] z roku 2004.

Velkou předností přípravků získaných podle předkládaného vynálezu je, že tyto přípravky jsou vhodné pro všechny aplikace, v nichž se jeví výhodné využít protiplísňových mykoparasitických, elicitorových a růstových vlastností mikroorganismu *Pythium oligandrum*. Zejména se tedy jedná o použití tohoto přípravku jako rostlinného biofungicidu, pro humánní a veterinární použití mikroorganismu *Pythium oligandrum*, pro rozrušení biofilmů a odstranění dysbiosy vyskytujících se při různých lékařských diagnosách a též pro komunální ochranu před plísněmi vyskytujícími se v životním a/nebo pracovním prostředí. V závislosti na použitých maticích v kapalném suspenzním koncentrátu lze tento použít jako ochranný postřik rostlin v přítomnosti degradovatelného biopolymeru, který slouží nejen jako ochranný faktor, ale také jako postupně se uvolňující degradovatelná matrice, a tedy vlastně jako „nosič“ materiálu Polyversum s oosporami aktivního mikroorganismu *Pythium oligandrum*.

Ochrana proti plísním, houbám, patogenním bakteriím a kvasinkám s použitím stabilizované koncentrované suspenze oospor mikroorganismu *Pythium oligandrum*, spočívající v aplikaci této stabilizované koncentrované suspenze, v neředěné nebo ředěné podobě, na místa postižená výskytem plísní nebo hub nebo patogenních bakterií nebo patogenních kvasinek nebo mikrobiální dysbiosou, umožňuje definovat široký okruh aplikací pro stabilizovaný kapalný koncentrát.

V oblasti rostlinné ochrany je možné kompozice využít k ochraně proti plísním, houbám, nebo patogenním bakteriím a kvasinkám tak, že se stabilizovaná koncentrovaná suspenze v ředěné nebo neředěné formě aplikuje na rostliny nebo jejich prostředí nebo semena nebo plodiny nebo plody a to jak před sklizní, tak po sklizni jako například i ve skladech, včetně aplikace ve formě aerosolů, samorozpustných kapslí obsahujících koncentrovanou suspenzi, přihnojování k patě rostlin, máčení plodin, postřik plodin, moření plodin, mlžení plodin, hnojení a přihnojování jako součást komplexních hnojiv, a aplikaci ve formě hydroponií.

Při ochraně dutiny ústní se může stabilizovaná koncentrovaná suspenze v ředěné nebo neředěné formě aplikovat na místa postižená orálním plakem nebo paradentózou, výskytem infikovaných nehojících se ran zejména u diabetiků, výskytem dermatofytálních nebo kvasinkových infekčních onemocnění a výskytem jiných symptomů spojených s mikrobiální dysbiosou kůže a povrchových sliznic člověka.

Pro použití v komunální ochraně se stabilizovaná koncentrovaná suspenze v ředěné nebo neředěné formě aplikuje na místa na zdech a zdivu postižená výskytem plísní. Další inovativní oblasti použití zahrnují protiplísňovou ochranu chladicích zařízení, klimatizací, oblastí postižených záplavami a povodněmi a jiná místa s častým výskytem cílových plísní pro mikroorganismus *Pythium oligandrum*.

Objasnění výkresů

Vynález je dále podrobně popsán na příkladných provedeních a blíže osvětlen na připojených schématických výkresech.

Obr. 1A, 1B, 1C blíže osvětlují srovnání rychlosti růstu fytopatogenní plísně *Fusarium graminearum* bez přítomnosti mikroorganismu *Pythium oligandrum* a v přítomnosti tohoto mikroorganismu.

Podrobněji ukazuje:

5 obr. 1A růst kolonií fytopatogenní plísně *Fusarium graminearum* samostatně (čtverec) a při současné inokulaci *Pythium oligandrum* z dormantních oospor a z kapalné a pevné kultivace (hvězdičky a trojúhelníky);

10 obr. 1B fotografie 4 příkladů Petriho misek na něž byl v levé části inokulován mikroorganismus *Pythium oligandrum* z dormantních oospor a v pravé části fytopatogenní plíseň *Fusarium graminearum* (horní řada) a na kontrolních miskách byla inokulována pouze plíseň *Fusarium graminearum*, přitom nárůst byl zaznamenán po 4 dnech;

15 obr. 1C Fotografie Petriho misek se současnou inokulaci mikroorganismus *Pythium oligandrum* z dormantních oospor fytopatogenní plísně *Fusarium graminearum*, kde nárůst byl zaznamenán po 11 dnech.

20 Obr. 2A, 2B, 2C znázorňují výsledky laboratorních pokusů s nárůstem pšenice v přítomnosti fytopatogenní plísně *Fusarium graminearum*, mikroorganismu *Pythium oligandrum*, a kombinace obou těchto mikroorganismů.

Podrobněji se ukazují na:

25 obr. 2A Erlenmayerovy baňky, v nichž rostla na agarové půdě pšenice v přítomnosti pouze fytopatogenní plísně *Fusarium graminearum*, tvořící bílé ostrůvky, zaznamenány po 20 dnech od inokulace ke klíčku pšenice;

30 obr. 2B Erlenmayerova baňky, v nichž rostla na agarové půdě pšenice v přítomnosti jak fytopatogenní plísně *Fusarium graminearum*, tak také mikroorganismu *Pythium oligandrum*, baňky byly zaznamenány po 20 dnech od současné inokulace ke klíčku pšenice; a

35 obr. 2C Erlenmayerovy baňky, v nichž rostla na agarové půdě pšenice v přítomnosti pouze mikroorganismu *Pythium oligandrum*, baňky byly foceny po 20 dnech od inokulace této plísně ke klíčku pšenice.

Na obr. 3A, 3B, 3C, 3D, 3E je vyobrazena aplikace protiplísňového přípravku na ochranu rostlin podle příkladu provedení 1 a následná analýza populační dynamiky mikroorganismu *Pythium oligandrum* pozorovaná v polním pokuse na pšenici a přilehlé půdě včetně reakce na přítomnost plísní sledovaná genovou expresí a genetické sledování úrovně plísňové kontaminace.

40 Podrobněji znázorňují na:

45 obr. 3A obsah mikroorganismu *Pythium oligandrum* stanovený genetickým testem na rostlinách (světle šedé sloupce) a v okolní přilehlé půdě (tmavě šedé sloupce) v různých časech po aplikaci;

50 obr. 3B vývoj teplot měřených infračerveným teploměrem přímo na poli v době odběrů (světle šedé sloupce) a teplotní záznam získaný z místní meteorologické stanice (tmavě šedé sloupce);

55 obr. 3C průběh genových expresí genu pro celulasu (POCELL), endo- β -glukanasu (POENDO) a strukturní protein bohatý na serin a threonin (POSTRU) v jednotlivých částech rostliny a v okolní půdě (So, půda, R, kořen, St, stonek, L, list) sledovaný v čase 6 až 120 h, přičemž úroveň exprese genů byla normalizována na expresi konstitutivního genu β -tubulinu (POTUBU) a je vyjadřována oproti kontrole bez aplikace přípravku dle citované metodiky [12];

60 obr. 3D úroveň plísňové kontaminace v identických vzorcích jako v panelu C měřenou pomocí kvantitativní PCR s obecnými amplifikačními primery pro amplifikaci plísní.

obr. 3E korelační graf sledující korelaci mezi úrovní exprese genu pro celulasu (POCELL) a úrovní plísňové kontaminace.

Obr. 4A, 4B, 4C, 4D znázorňují test účinnosti zubních past dle příkladu provedení číslo 4 z hlediska jejich schopnosti eliminovat biofilmy uměle vytvořené na keramických hydroxylapatitových destičkách, a to v horní části obrázku s použitím slin zdravého jedince a ve spodní části obrázku s použitím slin jedince postiženého paradentózou.

Podrobněji se ukazuje na:

obr. 4A fotografie šestijamkové destičky s použitím slin zdravého jedince po uvolnění promytých biofilmů do roztoku a vyjmutí keramických hydroxylapatitových destiček, které byly předtím čištěny kartáčkem bez pasty, pastou Odol, pastou Enzycal, pastou s glycerolem dle příkladu provedení číslo 4 bez přídavku mikroorganismu *Pythium oligandrum*, pastou s glycerolem dle příkladu provedení číslo 4 bez přídavku oxidu křemičitého a úplnou pastou s glycerolem dle příkladu provedení číslo 4;

obr. 4B kvantitativní vyhodnocení obsahu biofilmu měřením intenzity zabarvení v jednotlivých jamkách obr. 1A na destičkovém spektrofotometru při vlnové délce 562 nm;

obr. 4C fotografie šestijamkové destičky s použitím slin jedince s paradentózou po uvolnění promytých biofilmu do roztoku a vyjmutí keramických hydroxylapatitových destiček, které byly předtím čištěny kartáčkem bez pasty, pastou Odol, pastou Enzycal, pastou s glycerolem dle příkladu provedení číslo 4 bez přídavku mikroorganismu *Pythium oligandrum*, pastou s glycerolem dle příkladu provedení číslo 4 bez přídavku oxidu křemičitého a úplnou pastou s glycerolem dle příkladu provedení číslo 4; a

obr. 4D kvantitativní vyhodnocení obsahu biofilmu měřením intenzity zabarvení v jednotlivých jamkách obr. 1C na destičkovém spektrofotometru při vlnové délce 562 nm.

Příklady uskutečnění vynálezu

Biologický protiplísňový kapalný prostředek obsahuje mikroorganismy *Pythium oligandrum* a ve všech příkladných provedeních, mikroorganismem *Pythium oligandrum* je kmen *Pythium oligandrum* Drechsler ATTC 38472, který byl deponován v České sbírce mikroorganismů CCM, Masarykova Univerzita v Brně, pod označením *Pythium oligandrum* M1, a pod tímto označením je dále uváděn v příkladných provedeních.

Dále je uvedena Sekvenční Listina tohoto mikroorganismu dle ST25_PCT:

<160>	2
<210>	1
<211>	759
<212>	DNA
<213>	<i>Pythium oligandrum</i> strain M1
<221>	ITS rRNA gene
<400>	1

```

atcatttacc caccataaaaa ctttccacgt gaacpgttat aaatatgttc tgtgotttct 60
cgcaagactt gaggttgaa cgaaggtgagt cgcggtctat ttgggtatcg gatttgctga 120
tgktaattta aacacotatt acttaalact gaactatact ccgaatacga aagtttttgg 180
ttttaacaat taacaacttt cagcagtgga tgtctagggc cgcacatcga tgaagaacgc 240
tgcgaactgc galacglaal ggcgaattga gaattcagtg agtcacogaa attttgaacg 300
catattgcac ttccgggtta tgcctggaag tgcgctcga taagtgtcgg tacatcaaac 360
ttgcctttct ttttttgtgt agtcaaaaatt agagatggca gaatgtgagg tgcctcgcgc 420
tgtcttttta aagatgggtc ggtccctttt aaatglaagt tgattcttcc ttgtgtctgc 480
gaattgcgat gctatgctct ttgtgacggg tttagattgc ttgctcctgg tgggogactt 540
cggttaggac atctggaagc aacotcaatt ggcggtatgt tgggotttgc ctgaacgttaa 600
gctaagcgag tctagttttc tgtcttttcc ttgaggtgta cctgtcgtgt gtyaggttga 660
tttaggctat atgggtgctt ggttgtgtgg tttagcgttt tcagaagcct gcttcggtag 720
gtaaaggaga caacaccaat ttgggaactga gagtttact 759

```

```

5 <210> 2
  <211> 683
  <212> DNA
  <213> Pythium oligandrum strain M1
  <221> Mitochondrial COXII cytochrome oxidase
  <400> 2
10

```

```

atggaaggta ttacaaactt tcatcatgat ttgthacccc ttttaattat tctgactgtt 60
tttgttttgc ggttatttatt tagagtaaac gtattattcg atgaaaaaaa aaacccaata 120
ccgctacat ttgtacatgg agcaactatt gaaattattt ggcacacaat tccagcatta 180
attttattaa ccgtagcagt tccatctttt gctttattat attcaatgga tgaattattt 240
gatccaatta taacttttaa agtaataggt agtcaatggt actggagata tgaatattct 300
gataatttag aatttgcaga tgaaccttta atttttgata gttacatggt tcaagataat 360
gacttagaaa taggacaatt taggttatta gaagtagaca accgtgtttg tgtaccaaact 420
aatagccata tttaggtttt aataacagct tctgacgttt tacattcatg ggctataccc 480
tctthagggt taaaattaga tgcctgtcca ggtcgtttta atcaaaactt aatgtttatt 540
aaaagagaag ggttatttta cgttcaatgt agtgaatat gtggtataaa tcatggtttt 600
atgcceatag ttgttgaagc agtttcatta gaagattatt tagtttgggt aaaaaacaaa 660
ttaattttga ttttaattga taa 683

```

Příklad 1

Biologický protiplísňový kapalný prostředek určený k postřikům kulturních plodin s vysokým hmotnostním procentem biomasy

Příprava:

Biomasa získaná kultivací mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 na pevném substrátu byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) smíchána s demineralizovanou vodou a homogenizována. Homogenizace proběhla za otáček 3000 až 5000 ot/min po dobu 3 minut. Následně byl do výchozí neředěné suspenze přidán osmolyt (sacharóza) v množství, které odpovídá výsledné hmotnostní koncentraci 60 % hmotn. a požadovanému počtu oospor. Suspenze s osmolytem (sacharózou) byla poté homogenizována v mixéru 1 minutu při 2000 ot/min. Poté byla suspenze uložena do sterilních nerezových tanků při teplotě pod 8 °C.

Výhodněji byl biologický protiplísňový kapalný prostředek připraven sloučením kroků homogenizace v demineralizované vodě a následného přidání osmolytů (sacharózy) v jeden, a to tím způsobem, že biomasa získaná pevnou kultivací byla homogenizována v nádobě průmyslového homogenizátoru v roztoku osmolytů (65% roztoku sacharózy). Homogenizace proběhla za otáček 3000 až 5000 ot/min po dobu 3 minut. Po stanovení počtu oospor ve výchozí suspenzi, byla tato suspenze zředěna osmolytem (65% roztokem sacharózy) běžným způsobem tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace oospor v přípravku. Následně byla suspenze uložena do sterilních nerezových tanků při teplotě pod 8 °C.

Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací s Etzeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení přípravku:

Sacharóza jako stabilizátor	60 % hmotn.
Voda jako stabilizátor	30 % hmotn.
Kultivační biomasa	10% hmotn.
Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i>	5×10^5 /1 ml.

Vlastnosti:

Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 2

Biologický protiplísňový kapalný prostředek určený k postřikům kulturních plodin s nízkým hmotnostním procentem biomasy

Příprava:

Biomasa *Pythium oligandrum* získaná kapalnou kultivací byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) smíchána s osmolytem (sacharózou) a homogenizována tak, aby bylo dosaženo požadovaného počtu oospor a koncentrace osmolytů (sacharózy). Homogenizace proběhla při rychlosti 3000 až 5000 ot/min po dobu 3 minut. Poté byla suspenze uložena ve sterilních nerezových tancích při teplotě pod 8 °C. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v

souladu s publikací Etxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

5

Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Sacharóza jako stabilizátor

64 % hmotn.

Voda jako stabilizátor

35,9 % hmotn.

Kultivační biomasa

0,1% hmotn.

10 Počet dormantních oospor mikroorganismu *Pythium oligandrum M1*

5 x 10⁵ /l ml.

Vlastnosti:

Příklad 3

15

Biologický protiplísňový kapalný prostředek určený k moření zrna

Příprava:

20

Biomasa získaná kultivací mikroorganismu *Pythium oligandrum M1* na pevném substrátu byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) smíchána s demineralizovanou vodou a homogenizována. Homogenizace proběhla při 3000 až 5000 ot/min po dobu 3 minut. Následně byl do výchozí neředěné suspenze přidán osmolyt (sacharóza) v množství, které odpovídá výsledné hmotnostní koncentraci 60 % hmotn. a požadovanému počtu oospor. Suspenze s osmolytem (sacharózou) byla poté homogenizována v mixéru 1 minutu.

25

Výhodněji byl prostředek připraven sloučením kroků homogenizace v demineralizované vodě a následného přidání osmolytů (sacharózy) v jeden, a to tím způsobem, že biomasa získaná pevnou kultivací byla homogenizována v nádobě průmyslového homogenizátoru v roztoku osmolytů (65% roztoku sacharózy). Homogenizace proběhla za otáček 3000 až 5000 ot/min po dobu 3 minut. Po stanovení počtu oospor ve výchozí suspenzi, byla tato suspenze zředěna osmolytem (65% roztokem sacharózy) běžným způsobem tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace oospor v přípravku. Následně byla suspenze uložena do sterilních nerezových tanků při teplotě pod 8 °C.

35

Poté byla získaná suspenze uložena ve sterilních nerezových tankách při teplotě pod 8 °C. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Etxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

40

Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

45

Složení:

Sacharóza jako stabilizátor

60 % hmotn.

Voda jako stabilizátor

36 % hmotn.

Kultivační biomasa

4 % hmotn.

50 Počet dormantních oospor mikroorganismu *Pythium oligandrum M1*

2,5 x 10⁶/l ml.

Příklad 4

Biologický protiplísňový kapalný prostředek jakožto suspenzní koncentrát s nízkým obsahem vody

55

Příprava:

Biomasa *Pythium oligandrum* M1 z kapalně kultivace byla po sklizení odstředěna. Supernatant byl po odstředění odstraněn a odstředěný materiál byl doplněn parafinovým olejem tak, aby výsledný počet oospor byl 500 000 oospor na 1 ml přípravku. Poté byla směs homogenizována v průmyslovém mixéru po dobu 3 minut. Suspenze byla uložena ve sterilních nádobách při teplotě pod 8 °C. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

15	Kultivační biomasa	0,1 % hmotn.
	Parafinový olej jako stabilizátor	99,9 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	5×10^5 /1 ml.

Vlastnosti:

20 Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 5

25 Biologický protiplísňový kapalný prostředek aplikovaný formou nanovláken tvořících postupně se uvolňující degradovatelnou matrix pro mikroorganismus *Pythium oligandrum* M1

Příprava:

30 Biomasa *Pythium oligandrum* z kapalně kultivace byla po sklizení odstředěna. Supernatant byl odstraněn a odstředěný materiál byl doplněn o osmolyt (65% sacharózu) a biopolymer, který pak byl dále zpracováván technologií elektrostatického zvlákňování s použitím netoxického, biodegradabilního polymeru polyvinylalkoholu (PVA). Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní

Složení:

40	1. Hlavní složka (kapalná suspenze mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> . z toho	84 % hmotn.
	Sacharóza jako stabilizátor	63 % hmotn.
	Voda jako stabilizátor	36 % hmotn.
45	Kultivační biomasa	1 % hmotn.
	2. PVA nosič	
	PVA jako degradovatelný nosič	16 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	5×10^6 /1 ml.

50

Vlastnosti:

Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

55

Příklad 6

Biologický protiplísňový kapalný prostředek aplikovaný ve formě impregnačního nátěru nebo nástřiku

Příprava:

Biomasa *Pythium oligandrum* M1 z kapalné kultivace byla po sklizení homogenizována a filtrována filtrační technologií separující částice s velikostí do 300 µm. Po odstředění byla takto připravená biomasa smíchána s minerálním olejem o nízké viskozitě, tak aby bylo dosaženo požadovaného počtu oospor v 1 ml přípravku. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Raftrový počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

Kultivační biomasa	0,1 % hmotn.
Minerální olej jako stabilizátor	99,9 % hmotn.
Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	2×10^5 /1 ml.

Vlastnosti:

Stabilita: 6 měsíců při teplotě 10 až 45 °C (v závislosti na typu sekundární látky).

Příklad 7

Biologický protiplísňový kapalný prostředek aplikovaný jako sanitační prostředek pro klimatizace

Příprava:

Biomasa *Pythium oligandrum* M1 z kapalné kultivace byla po sklizení homogenizována a filtrována filtrační technologií separující částice s velikostí do 100 µm. Po odstředění byla biomasa zředěna roztokem soli na požadovaný počet oospor v 1 ml přípravku. Princip působení je oplach či nástřik filtrů či potrubí klimatizačních nebo chladicích jednotek. Přítomnost mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 zaručuje odolnost vůči plísním a houbovým chorobám.

Čištění pylových filtrů:

Filtr byl ponořen do sanitačního roztoku a byl v něm ponechán působit po dobu 10 až 30 minut; poté opláchnut. Alternativou je, že tentýž roztok může být nastříkán na filtr v jeho pracovní pozici. Znečištění a zbytky činidla budou vyfoukány ven stlačeným vzduchem.

Sanitace odpařovače a filtrů:

Po vyčištění odpařovačů a/nebo filtrů se aplikuje roztok produktu bez oplachování. Výborného sanitačního účinku je dosaženo i tehdy, jestliže se produkt použije výhradně jenom jako detergent k omytí. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Raftrový počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

	Kultivační biomasa	0,1 % hmotn.
	Solný roztok jako stabilizátor	99,9 % hmotn.
5	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum M1</i>	5×10^5 /1 ml.

Vlastnosti:

- 10 Stabilita: 6 měsíců při teplotě 10 až 45 °C (v závislosti na typu sekundární látky).

Příklad 8

- 15 Biologický protiplísňový kapalný prostředek aplikovaný jako sanitační prostředek pro ošetření sedimentů – pro bahenní nánosy, vyplavené územní celky

Příprava:

- 20 Biomasa *Pythium oligandrum M1* z kapalné kultivace byla po sklizení homogenizována a filtrována filtrační technologií separující částice s velikostí do 400 µm. Po odstředění byla biomasa zředěna destilovanou nebo demineralizovanou vodou na požadovaný počet oospor v 1 ml přípravku. Principem působení je vytvoření vodné suspenze dle ředění uvedeného níže a aplikování v oblastech postižených kontaminovanými nánosy bahna a sedimentů, jako meliorační postup ke zlepšení vlastností půd a zemin. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Etzeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

- 30 Složení:

	Kultivační biomasa	0,1 % hmotn.
	Destilovaná voda jako stabilizátor	99,9 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum M1</i>	5×10^5 /1 ml.
35	Aplikační využitelnost je od 250 g/ha při koncentraci 500 000 oospor na ml.	

Vlastnosti:

- 40 Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 9

- 45 Biologický protiplísňový kapalný prostředek jakožto stabilizovaná vodná suspenze oospor *Pythium oligandrum M1*

Příprava:

- 50 Biomasa *Pythium oligandrum M1* získaná kapalnou kultivací je po odstředění (4000 ot/min, 5 min) a odstranění supernatantu smíchána se sterilní destilovanou vodou a homogenizována. Homogenizace probíhá za vysokých otáček (20 000 ot/min) po dobu 1 minuty. Poté může být suspenze podle potřeby filtrována a koncentrována za účelem získání suspenzního koncentráту obsahujícího v 1 ml požadovaný počet oospor *Pythium oligandrum M1* a neobsahujícího zbytky původního média ani zbytky mycelia. Získaný suspenzní materiál může být uložen ve sterilních tancích při teplotě 1 až 8 °C. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací

Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

5	Sterilní destilovaná voda jako stabilizátor	99,9 % hmotn.
	Kultivační biomasa	0,1 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum M1</i>	5×10^5 /l ml.

10 Vlastnosti:

Stabilita: minimálně 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 10

15 Biologický protiplísňový kapalný prostředek jakožto stabilizovaná suspenze s vysokou koncentrací oospor *Pythium oligandrum M1*

Příprava:

20 Biomasa *Pythium oligandrum M1* získaná kapalnou kultivací byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) homogenizována. Homogenizace proběhla při 20 000 ot/min po dobu 3 minut. Pote byla suspenze odstředěna a biomasa po odstranění supernatantu koncentrována na požadovaný počet oospor v 1 ml přípravku smícháním s osmolytem (65% sacharózou).
 25 Suspenzní koncentrát byl uložen ve sterilních nerezových tancích při teplotě pod 8 °C. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako
 30 stabilní.

Složení:

	Sacharóza jako stabilizátor	60 % hmotn.
35	Voda jako stabilizátor	35 % hmotn.
	Kultivační biomasa	5 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum M1</i>	2×10^7 l/ml.

Vlastnosti:

40 Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 11

45 Biologický protiplísňový prostředek ve formě pasty na bázi glycerolu

Příprava:

50 Do laboratorního homogenizátoru bylo nalito 1197,1 g glycerolu farmaceutické kvality (Glycerol 99 % PharmEur) a poté bylo opatrně přisypáno 239,4 g oxidu křemičitého Sident® 22 S, 43,1 g kultivační biomasy, 14,4 g vitamínu E a 6 g šalvějového aromátu. Směs byla míchána při 60 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla směs plněna po 75 g do plastových tub s uzávěrem, celkově bylo vyrobeno 20 ks takových tub. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla
 55 měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické

metody v souladu s publikací Etcheberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

5	Glycerol 99% Pharm Eur jako stabilizátor	79,77 % hmotn.
	SiO ₂ Sident® 22 S jako plnidlo na bázi oxidu křemičitého	16,00 % hmotn.
	Kultivační biomasa <i>Pythium oligandrum</i> M1	2,87 % hmotn.
	Vitamin E acetát jako aplikační látka	0,96 % hmotn.
10	Šalvějové aroma FC02 Bio 35 % jako aroma	0,40 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	2,5 x 10 ⁴ /1 ml.

Vlastnosti:

- 15 Stabilita: nejméně 6 měsíců při teplotě 25 °C.

Příklad 12

Biologický protiplísňový prostředek ve formě pasty na bázi olivového oleje

- 20 Příprava:

Do laboratorního homogenizátoru bylo nalito 600 g panenského olivového oleje a poté bylo opatrně přisypáno 120 g oxidu křemičitého Sident® 22 S, 21,6 g kultivační biomasy, 7,2 g vitamínu E a 3 g mátového aromátu. Směs byla míchána při 20 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla směs plněna po 75 g do plastových tub s uzávěrem, celkem bylo vyrobeno 10 takových tub. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Etcheberria a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

35	Olivový olej rafinovaný jako stabilizátor	79,77 % hmotn.
	SiO ₂ Sident® 22 S jako plnidlo na bázi oxidu křemičitého	16,00 % hmotn.
	Kultivační biomasa <i>Pythium oligandrum</i> M1	2,87 % hmotn.
	Vitamin E acetát jako aplikační látka	0,96 % hmotn.
	Esenciální oleje máta peprná HNA jako aroma	0,40 % hmotn.
40	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	2,5 x 10 ⁴ /1 ml.

Vlastnosti:

- 45 Stabilita: 6 měsíců při teplotě 25 °C.

Příklad 13

Biologický protiplísňový kapalný prostředek na ochranu akvatických organismů

- 50 Přípravek je určen k preventivní ochraně ryb a rybí násady (kapr, plotice, cejn) před spektrem plísňových onemocnění (zejména *Aspergillus spp.*). Přípravek je aplikován preventivně do chovných nádrží. Přípravek je dále určen k preventivní ochraně rybích jiker před napadením spektrem plísňových onemocnění (zejména rody *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*).

55

Příprava:

Biomasa *Pythium oligandrum* M1 získaná kapalnou kultivací byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) homogenizována. Homogenizace proběhla při 20 000 ot/min po dobu 3 min. Poté byla suspenze odstředěna a biomasa po odstranění supernatantu koncentrována na požadovaný počet oospor v 1 ml přípravku smícháním s osmolytem (65% sacharózou). Suspenze byla uložena ve sterilních nerezových tancích při teplotě pod 8 °C. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Etcheberry a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

15	Sacharóza jako stabilizátor	63 % hmotn.
	Voda jako stabilizátor	36 % hmotn.
	Kultivační biomasa	1 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	5×10^6 /1 ml.

20 Vlastnosti:

Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 14

25

Biologický protiplísňový tekutý přípravek k ošetření včelích plástů

Přípravek je určen k preventivnímu ošetření včelích plástů před napadením širším spektrem plísň především rodu *Aspergillus* a *Fusarium*. Přípravkem lze ošetřit plásty určené k uskladnění mimo včelí úl i plásty uvnitř včelího úlu neobsazeného včelami.

Příprava:

Biomasa *Pythium oligandrum* M1 získaná kapalnou kultivací byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) smíchána s osmolytem (sacharózou) a homogenizována tak, aby bylo dosaženo požadovaného počtu oospor a koncentrace osmolytů (sacharózy). Homogenizace proběhla při 20 000 ot/min po dobu 3 minut. Poté byla suspenze uložena ve sterilních nerezových tancích při teplotě pod 8 °C. Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Etcheberry a kol. [13] z roku 2011. Pokud množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Složení:

45	Sacharóza jako stabilizátor	64 % hmotn.
	Voda jako stabilizátor	35,9 % hmotn.
	Kultivační biomasa	0,1 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	1×10^6 /1 ml

50

Vlastnosti:

Stabilita: 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

55

Příklad 15

Biologický protiplísňový kapalný prostředek jakožto bezvodý suspenzní koncentrát určený k postřikům kulturních plodin

5

Biomasa získaná kultivací mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 na pevném substrátu byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) smíchána demineralizovanou vodou a homogenizována. Homogenizace proběhla za otáček 3000 až 5000 ot/min po dobu 3 minut. Po homogenizaci byla získaná suspenze smíchána s anorganickým nosičem (Sipernat), usušena a semleta odstředivým mlýnem na výslednou velikost částic do 350 µm. Suchá, kultivační biomasa s nosičem pak byla smíchána s parafinovým olejem tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace oospor v přípravku. Suspenze byla uložena ve sterilních nádobách při teplotě do 25 °C.

Výhodou přípravku oproti příkladu jedna je delší stabilita přípravku, která je zajištěna přítomností vody. Anorganický nosič na bázi oxidu křemičitého zajišťuje dobrou suspendovatelnost pevných částic (biomasy) v přípravku.

Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky, stabilita byla stanovena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací s Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011.

Složení:

25	Kultivační biomasa	1,5 % hmotn.
	Sipernat 22 jako anorganický nosič	6,5 % hmotn.
	Parafinový olej jako stabilizátor	92 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	1 x 10 ⁶ /1 ml

30 Vlastnosti:

Stabilita: 24 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 16

35

Biologický protiplísňový kapalný prostředek jakožto bezvodý suspenzní koncentrát určený k postřikům kulturních plodin v ekologickém zemědělství

Biomasa získaná kultivací mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 na pevném substrátu byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) smíchána demineralizovanou vodou a homogenizována. Homogenizace proběhla za otáček 3000 až 5000 ot/min po dobu 3 minut. Po homogenizaci byla získaná suspenze smíchána s anorganickým nosičem (Sipernat), usušena a semleta odstředivým mlýnem na výslednou velikost částic do 350 µm. Suchá, kultivační biomasa s nosičem pak byla smíchána se slunečnicovým olejem tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace oospor v přípravku. Suspenze byla uložena ve sterilních nádobách při teplotě do 25 °C.

Výhodou přípravku oproti příkladu jedna je delší stabilita přípravku, která je zajištěna přítomností vody. Anorganický nosič na bázi oxidu křemičitého zajišťuje dobrou suspendovatelnost pevných částic (biomasy) v přípravku.

Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Rafterovy počítací komůrky, stabilita byla stanovena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací s Ettxeberria a kol. [13] z roku 2011.

55

Složení:

	Kultivační biomasa	1,5 % hmotn.
	Sipernat 22 jako anorganický nosič?	6,5 % hmotn.
5	Slunečnicový olej jako stabilizátor	92 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	1 x 10 ⁶ /1 ml

Vlastnosti:

- 10 Stabilita: 24 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 17

- 15 Biologický protiplísňový tekutý přípravek se sníženou koncentrací oospor

Biomasa *Pythium oligandrum* M1 získaná kapalnou kultivací byla v nádobě homogenizátoru (průmyslového mixéru) smíchána s osmolytem (sacharózou) a homogenizována tak, aby bylo dosaženo požadovaného počtu oospor a koncentrace osmolytů (sacharózy). Homogenizace proběhla při 20 000 ot/min po dobu 3 minut. Následně byla suspenze smíchána s osmolytem (65% sacharózou) tak, aby koncentrace oospor v přípravku odpovídala požadavkům na přípravku. Poté byla suspenze uložena ve sterilních nerezových tancích při teplotě pod 8 °C.

Počet dormantních oospor byl stanoven mikroskopicky s použitím Sedgewick–Raftrovy počítací komůrky a stabilita byla měřena na základě mikroskopického sledování počtu viabilních oospor s použitím plazmolytické metody v souladu s publikací Etxeberria a kol. [13] z roku 2011. Počet dormantních oospor se v případě potřeby stabilizuje běžným způsobem.

Složení:

30	Sacharóza jako stabilizátor	64,95 % hmotn.
	Voda jako stabilizátor	35 % hmotn.
	Kultivační biomasa	0,05 % hmotn.
	Počet dormantních oospor mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1	1 x 10 ³ /1 ml

- 35 Vlastnosti:

Stabilita: 12 měsíců při teplotách od 2 do 8 °C; 6 měsíců při teplotě do 25 °C.

Příklad 18

- 40 Test laboratorní účinnosti biologických protiplísňových kapalných prostředků na mykoparasitických experimentech

Laboratorní test proliferace *Pythium oligandrum* M1 z dormantních oospor suspenzního koncentrátu podle příkladu provedení 1 a následného mykoparasitismu na fytopatogenní plísni *Fusarium graminearum* byl proveden na sterilních agarových plotnách s živným médiem na bázi sladového extraktu. Zředěný koncentrát na aplikační úroveň, tj. 0,2 ml koncentrátu na 1 l vody, byl nanesen na agarovou plotnu, část této plotny byla po vyklíčení oospor vyjmuta a přenesena na jiný agar, který byl současně inokulován plísni *Fusarium graminearum*.

Výsledek tohoto testu je představen na Obr. 1 ukazujícím významné zastavení růstu fytopatogenní plísně *Fusarium graminearum* po přidání mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 ve srovnání se standardním růstem (obr. 1A). Tato situace je dále ilustrována pomocí série Petriho misek vyfotografovaných po 4 dnech jednak společného růstu obou mikroorganismů a jednak růstu samotné fytopatogenní plísně (obr. 1B). Po 11 dnech kultivace je patrné výrazné potlačení fytopatogenní plísně nárůstem mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 (obr. 1C). Pokud

množství viabilních oospor nepokleslo pod 90 % výchozí hodnoty, byl přípravek označen jako stabilní.

Příklad 19

5

Protiplísňová účinnost vůči fytopatogenním plísním demonstrovaná v laboratorním experimentu s pšenicí

10

Semena kulturních plodin (pšenice) byla ošetřena roztokem Sava (1 až 5% roztok) a naklíčeny na soil extract agaru. Po naklíčení byly klíčky znova ošetřeny 1% roztokem Sava a umístěny na vrstvu fytoagaru v 250 ml Erlenmayerově baňce. Baňky byly inokulovány kouskem agaru (5 mm) s fytopatogenem *Fusarium graminearum* nebo mikroorganismem *Pythium oligandrum* M1 (dormantní oospory v suspenzním koncentrátu) o aplikační koncentraci 0,2 ml/L a objemu 0,2 ml ve variantách: 1) fytopatogen: 2) fytopatogen + *Pythium oligandrum* M1: 3) pouze *Pythium oligandrum* M1; 4) kontrolní vzorek, který nebyl inokulován. Baňky byly uzavřeny tenkou vrstvou buničiny a gázy. Kultivace probíhala v místnosti při teplotě 24 °C. Byl sledován nárůst kolonie fytopatogenů a mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 a stav rostliny.

15

20

Výsledek tohoto laboratorního experimentu je představen na obr. 2. V případě přidání samotného fytopatogena je dobře patrný nejen jeho významný nárůst v okolí rostoucí pšenice, ale též poškození rostliny tímto patogenem (obr. 2A). Pokud byl kromě fytopatogenní plísně přidán i mikroorganismus *Pythium oligandrum* M1, nebyla přítomnost fytopatogena viditelná a docházelo k dobrému nárůstu pěstované rostliny (obr. 2B). Kontrolní experiment provedený pouze v přítomnosti mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 ukázal normální nárůst rostlinek pšenice, který byl srovnatelný s experimenty bez přidání jakéhokoli mikroorganismu (obr. 2C).

25

Příklad 20

30

Test účinnosti biologického protiplísňového kapalného prostředku určeného k postřikům kulturních plodin podle příkladu provedení č. 2 ve skleníkovém pokuse na řepce *Brassic napus*

35

Byly použity 4 sektory ve firemním skleníku v Uherském Brodě s rostoucí řepkou *Brassica napus* var. Lohana C1, přičemž aplikace byla zahájena ve stádiu BBCh 15 - 21. V prvním sektoru byl aplikován sypký biofungicid s mykoparazitickým mikroorganismem *Pythium oligandrum* M1 (Polyversum®), ve druhém sektoru byl aplikován nový kapalný fungicid podle příkladu provedení 1 tohoto vynálezu, ve třetím sektoru nový kapalný protiplísňový přípravek podle příkladu provedení 2 tohoto vynálezu a v posledním čtvrtém sektoru byl aplikován nový kapalný protiplísňový prostředek podle příkladu provedení 4 tohoto vynálezu. Ve všech případech byla aplikační koncentrace 0,5 g/L popřípadě 0,5 ml/L s rozprášením 100 ml takto koncentrovaného přípravku na 1 m² ošetřené plochy. V každém sektoru bylo označeno odběrové místo pro odběr vzorků zahrnujících rostlinu a půdu mezi řádky. Během každého odběru byly též prováděny fotodokumentace a odečet teploty ve skleníku v okamžiku odběru. Odebrané vzorky byly během hodiny přeneseny do laboratoře a uloženy v mrazničce při -20 °C až do okamžiku analýzy. Odběry byly provedeny před aplikací protiplísňových přípravků a poté 1 hodinu, 2 hodiny, 7 hodin, 20 hodin, 2 dny, 3 dny, 4 dny, 5 dnů, 6 dnů, 7 dnů, 8 dnů, 11 dnů, 14 dnů, 17 dnů a 20 dnů po aplikaci.

45

50

Laboratorní zpracování vzorků zahrnovalo fotodokumentaci jednotlivých rostlin, separaci listu a kořene, stanovení vlhké hmotnosti vzorku, homogenizaci vzorku v DNA extrakčním pufru, centrifugaci a provedení molekulárních analýz. Kvantitativní stanovení přítomnosti mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 bylo provedeno metodou qPCR se sondou cílenou na ITS sekvence, kvantitativní stanovení DNA řepky bylo provedeno identickou metodou se sondou cílenou na *Fat(A)A* sekvenci. Kvantitativní stanovení zahrnovalo provedení 50 cyklů DNA amplifikace za standardních podmínek a výpočet koncentrace cílových sekvencí pomocí kalibrační křivky. Podobně byla též detekována úroveň plísňového zamoření na základě standardního protokolu.

55

Výsledky testu účinnosti jsou uvedeny v následující Tabulce 1. Účinnost dosahovaná pro nové kapalně protiplísňový přípravky podle tohoto vynálezu je ve všech případech srovnatelná nebo lepší než účinnost pevného sypkého přípravku. K potlačení cizorodých plísní vždy docházelo v závislosti na kolonizaci a amplifikaci mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 na místě aplikace. Nízká úroveň kontaminace plísními se poté udržela i po snížení koncentrace mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 na konci experimentu. Dynamika populace mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 byla sledována v tomto experimentu pouze po dobu 15 dní, a proto není možné komentovat dlouhodobé efekty. Nicméně z hlediska protiplísňové účinnosti přípravku je nepochybné, že schopnost potlačit plísně je významná a dlouhodobá: došlo ke snížení výskytu těchto plísní zhruba o jeden řád za 24 hodin po aplikaci, a za dalších 24 hodin se jednalo také o snížení téměř o řád.

Tabulka 1

15

Měření obsahu mikroorganismu <i>Pythium oligandrum</i> M1a a měření obsahu plísní na listech řepky ve skleníkovém pokusu. Výsledky jsou uvedeny jako počty detekovaných diploidních genomů na 1 µg hostitelské DNA řepky.								
Čas odběru (h)	Sektor 1		Sektor 2		Sektor 3		Sektor 4	
	<i>Pythium</i>	Plísně	<i>Pythium</i>	Plísně	<i>Pythium</i>	Plísně	<i>Pythium</i>	Plísně
0	8×10^2	1×10^6	7×10^2	1×10^6	8×10^2	2×10^6	6×10^2	2×10^6
2	2×10^3	8×10^5	1×10^4	1×10^6	1×10^4	1×10^6	2×10^4	1×10^6
20	2×10^3	1×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^3	3×10^5	2×10^5	2×10^5
26	5×10^3	6×10^4	6×10^3	6×10^4	7×10^3	5×10^5	6×10^5	5×10^5
44	1×10^6	2×10^4	2×10^6	2×10^4	1×10^6	2×10^4	2×10^6	1×10^4
92	8×10^3	1×10^3	8×10^3	2×10^5	7×10^5	1×10^5	7×10^5	3×10^5
140	1×10^3	5×10^3	3×10^4	6×10^5	4×10^3	6×10^5	4×10^5	5×10^3
212	1×10^3	5×10^3	2×10^4	5×10^3	2×10^3	7×10^5	2×10^3	6×10^5
356	8×10^3	6×10^3	1×10^3	4×10^5	1×10^4	5×10^5	1×10^4	4×10^5

Příklad 21

Test účinnosti biologického protiplísňového kapalného prostředku určeného k postřikům kulturních plodin podle příkladu provedení 1 v polním pokuse na pšenici *Triticum aestivum*

Ozimá pšenice *Triticum aestivum* byla vyseta v říjnu 2015 na firemním poli v blízkosti osady Úherce u Loun. V souladu s agrotechnickými normami a schválenou registrací pro protiplísňový přípravek pro rostlinnou ochranu *Polyversum*® byla v listopadu 2015 provedena na vyznačených drahách aplikace protiplísňového přípravku podle příkladu provedení 1 tohoto vynálezu standardní postřikovou metodou v množství 100 ml na 1 ha. Na 4 vyznačených odběrových místech byly prováděny odběry před aplikací a dále různý počet dní po aplikaci, odebrány byly rostoucí rostliny pšenice a dále půda v blízkosti odběru. Ihned po odběru byly vzorky zmrazeny a uchovávány v uzavřených sáčcích nebo zkumavkách při -20°C až do okamžiku analýzy. Nukleové kyseliny byly z odebraných vzorků extrahovány s využitím publikované metodiky (Klimeš R, Suchánek M, Maštalková L a spol. /2016/ Comparison of the efficacy of treatment of dermatophytosis by chemical and biological antifungals: soil peronosporomycete *Pythium oligandrum* as efficient as the antifungal enilconazole in the guinea pig model. Vet Dermatol, v tisku) a použity pro molekulární analýzy).

Pokud jde o dynamiku výskytu mikroorganismu *Pythium oligandrum M1* po postřiku kapalným přípravkem podle příkladu provedení 1, normalizované koncentrace na rostlinách a v okolní půdě sledovaly podobnou závislost. Zatímco před aplikací mohly být genetickým testem qPCR identifikovány jen jednotlivé buňky na g vzorku, po aplikaci kapalného preparátu odpovídajícího standardnímu normalizovanému množství se tento počet zvýšil na stovky buněk na g vzorku. Po 48 hodinách po aplikaci došlo k viditelnému namnožení mikroorganismu *Pythium oligandrum M1* za daných experimentálních podmínek, přičemž tento pozitivní trend byl přerušen za podmínek konkrétního experimentu mrazovou epizodou počátkem prosince 2015, po níž se již dynamický populační růst neobnovil (srovnej obr. 3A a obr. 3B).

Množství hodnotných informací bylo získáno analýzou genových expresních profilů metodou RT-qPCR prováděných ve „vrcholové“ fázi experimentu s největším nárůstem mikroorganismu *Pythium oligandrum M1*. Hodnoty koncentrací transkriptů ukázaly rychlou reakci na vyskytující se fungální patogeny v první fázi (výrazná exprese genu pro celulasu) následované zvýšeným výskytem zoospor (exprese endoglukanasy). Teprve po 48 a 120 h je zvýšený charakteristický genový marker sporulace, a to zejména v okolní půdě a kořeni (obr. 3C). Zároveň bylo možné pozorovat významné snížení relativního obsahu plísni již 48 hodin po aplikaci (obr. 3D) a toto snížení recipročně korelovalo s expresí genu pro celulasu odpovědnou za degradaci povrchových sacharidů v plísniích během mykoparasitického působení mikroorganismu *Pythium oligandrum M1* (obr. 3E).

Příklad 22

Test účinnosti zubních past v modelu orálního biofilmu s mechanickým odstraňováním plaku.

Pro sledování účinnosti připravených zubních past byl proveden laboratorní test s použitím modelu orálního biofilmu s mechanickým odstraňováním plaku dle publikace Verkaik MJ a spol. [14] z roku 2010. Byla použita verze (B) výše publikovaného protokolu spočívající ve dvouhodinové adhezi s následným růstem přes noc (16-hodinový biofilm) a mechanickým čištěním. Účinnost glycerolové zubní pasty s mikroorganismem *Pythium oligandrum M1* a zubní pasty s olivovým olejem a mikroorganismem *Pythium oligandrum M1* při odstranění mikroorganismů zubního plaku byla srovnána se dvěma druhy běžně dostupných zubních past (Odol a Enzycal) a jako kontrola bylo použito pouze mechanické čištění zubním kartáčkem bez pasty (označeno Kontrola). V kontrolním experimentu byla použita identická pasta jednak bez obsahu *Pythium oligandrum* a jednak bez použitého abraziva oxidu křemičitého.

Výsledek tohoto testu je popsán na výsledkové tabuli v obrázku 4. Ten prokázal, že pasta podle příkladu provedení číslo 4 vykazovala významně vyšší účinnost při odstranění zubního biofilmu a plaku než alternativní používané přípravky, dokonce i u jedinců postižených paradentózou (obr. 4A až obr. 4D). Zatímco dosud běžně používané pasty snížily intenzitu tvorby biofilmu zhruba na polovinu, nové pasty podle tohoto vynálezu až na desetinu. U kontrolní pasty bez obsahu mikroorganismu *Pythium oligandrum M1* byl její účinek srovnatelný s běžnými pastami, u kontrolní pasty bez oxidu křemičitého již byl účinek významně vyšší. U pacienta s periodontálním onemocněním byla celková úroveň tvorby biofilmu významně vyšší a bylo možno i lépe pozorovat rozdíly v účinnosti jednotlivých past.

Příklad 23

Test účinnosti biologického protiplísňového kapalného prostředku podle příkladu provedení 1 na ochranu obytných prostor před sporami plísni

Protiplísňový přípravek podle příkladu provedení číslo 1 byl naředěn vodou na koncentraci 330 000 oospor na litr aplikačního roztoku, tj. bylo přidáno 0,66 ml kapalného koncentrátu na 1 litr roztoku. Dále byl připraven kontrolní roztok za identických podmínek, avšak bez obsahu biomasy *Pythium oligandrum M1*, biomasa byla nahrazena vodou. Takto připravené roztoky byly

aplikovány ve dvou malých uzavřených místnostech v zemědělské usedlosti v Uherských u Loun
 čp. 2 ve formě rozstříku jemné mlhy rozprašovačem. Po aplikaci byly obě místnosti neprodyšně
 uzavřeny a byly prováděny spadové zkoušky na obsah spor metodou podle Omeljanského.
 Výsledky byly vyhodnoceny v laboratoři Dr. Miroslava Kolaříka v Mikrobiologickém ústavu A
 V ČR v Praze.

Výsledky experimentu jsou znázorněny v níže uvedené Tabulce 2. Experiment probíhal v
 uzavřených místnostech bez proudění vzduchu, proto jsou pozorované změny pomalejší a byly
 pozorovatelné až po několika měsících. Z výsledků je nicméně patrné, že v kontrolní místnosti 1
 s aplikací pomocných látek zjištěné počty spor kolísaly, po celou dobu pozorování však
 nepoklesly pod limit WHO (Světové zdravotnické organizace) ve výši 500 spor na 1 m³ vzduchu.
 Naopak v místnosti 2 došlo po 3 měsících od aplikace ke statisticky významnému poklesu spor,
 který posléze poklesl pod limit WHO 6 měsíců od data provedení aplikace.

Tabulka 2

Měření počtu plísňových spor na 1 m ³ v místnosti 1 s aplikací kontrolního přípravku a v místnosti 2 s aplikací přípravku s aktivní látkou <i>Pythium oligandrum</i> M1				
Měsíce po aplikaci (0 – před aplikací)	0	1	3	6
Místnost 1 kontr.	5000	4500	3500	4500
Místnost 2 (přípravek podle příkladu provedení číslo 1)	5000	4000	1300	400

Příklad 24

Způsob výroby biologického protiplísňového kapalného prostředku s *Pythium oligandrum* M1

Detailní povaha biologického protiplísňového kapalného prostředku s *Pythium oligandrum* M1
 podle tohoto vynálezu byla podrobně demonstrována na předchozích příkladech provedení.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu výroby tohoto biologického protiplísňového kapalného
 prostředku s *Pythium oligandrum* M1 podle tohoto vynálezu.

K aerobní kultivaci oomycety *Pythium oligandrum* M1 v kapalně fázi se použije médium
 obsahující extrakt z obilovin, třtinovou melasu a další nezbytné živiny. Kapalně médium se
 sterilizuje v parním sterilizátoru. Po vychladnutí se zaočkuje jedním z vybraných kmenů *Pythium*
oligandrum M1. Po skončení kultivace, která trvá přibližně 13 dní, se biomasa sklídí a zpracuje,
 jak je uvedeno ve shora uvedených příkladech provedení.

Pro kultivaci mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 na pevném substrátu se připraví médium
 obsahující zrna obilnin, výhodně loupané obilky prosa, např. *Panicum miliaceum* L, které se
 smíchají s podílem živného kapalného média. Médium se v kultivačních nádobách sterilizuje v
 parním sterilizátoru. Po vychladnutí se médium naočkuje jedním z vybraných kmenů *Pythium*
oligandrum M1. Po skončení procesu kultivace, který trvá přibližně 8 dní, se sklizená biomasa
 dále zpracuje do formy suspenzního koncentráту, jak je popsáno ve shora uvedených příkladech
 provedení.

Po ukončení kultivační fáze *Pythium oligandrum* M1 v kapalně i pevně fázi se biomasa s kapalným médiem homogenizuje, např. průmyslovým mixérem tak, aby minimálně 95 % částic v suspenzi bylo v rozmezí 0,05 až 0,30 mm, s výhodou v rozmezí 0,050 až 0,125 mm. Homogenní suspenze je následně charakterizována počtem oospor. Podle počtu oospor se suspenze standardizuje – zkoncentruje nebo zředí – na předem požadovanou koncentraci oospor vhodnou k přípravě daného biologického protiplísňového kapalného prostředku.

Po ukončení kultivační fáze *Pythium oligandrum* M1 na pevném substrátu se biomasa homogenizuje, s výhodou průmyslovým mixérem, v odpovídajícím objemu demineralizované vody tak, aby výsledná velikost minimálně 95 % částic v suspenzi byla v rozmezí 0,050 až 0,300 mm, s výhodou v rozmezí 0,050 až 0,125 mm. Homogenní suspenze je následně charakterizována počtem oospor. Podle počtu oospor se získaná suspenze zkoncentruje nebo zředí na předem požadovanou koncentraci oospor vhodnou k přípravě daného biologického protiplísňového kapalného prostředku.

K zajištění maximální přípustné velikosti částic v daném rozmezí se po fázi homogenizace a koncentrování, případně naředění, suspenze separuje, např. filtruje. V případě získání částic kolem 0,05 mm až 0,125 mm je vysoká pravděpodobnost získání koncentrované suspenze, respektive téměř čisté koncentrované suspenze oospor *Pythium oligandrum* M1. Většina příkladných provedení shora uvedených měla velikost částic převážně 0,050 až 0,125 mm.

Vodná suspenze se při homogenizaci může stabilizovat přidavkem osmolytů a v kombinaci s uchováváním při teplotách nižších než 8 °C ji lze skladovat ve sterilních velkoobjemových nádobách.

V případě bezvodé suspenze mikroorganismu *Pythium oligandrum* M1 se po ukončení kultivační fáze na pevném substrátu nebo v kapalně fázi získaný materiál se homogenizuje, s výhodou průmyslovým mixérem tak, aby výsledná velikost minimálně 95 % částic v suspenzi byla 0,050 až 0,300 mm, s výhodou v rozmezí 0,050 až 0,125 mm. Získaná homogenní suspenze, charakterizována počtem oospor, se následně odstředí a odstředěný materiál se po odstranění supernatantu doplní olejem, na předem požadovanou koncentraci oospor vhodnou k přípravě daného biologického protiplísňového kapalného prostředku. Následně se získaný materiál resuspenduje, např. průmyslovým mixérem.

Konkrétní neomezující možné způsoby výroby jsou uvedeny ve shora uvedených příkladech provedení.

Průmyslová využitelnost

Nový kapalný protiplísňový prostředek obsahující stabilizovanou suspenzi oospor je možno vyrábět ve značných objemech především proto, že u tohoto prostředku jsou jak fáze fermentační výroby, tak fáze formulační technicky dobře zvládnuté. Nový kapalný prostředek najde uplatnění ve všech oblastech, v nichž byly doposud aplikovány a používány jiné formy mikroskopické oomycety *Pythium oligandrum*, zejména tedy v biologické ochraně rostlin, pro ochranu budov a obydlí před plísněmi a popřípadě i pro potlačování plísní a kvasinek a při nastolení fyziologické rovnováhy mikroflóry při humánních a veterinárních aplikacích. Jako velmi inovativní je možno uvést použití jako ochranného postřiku rostlin s degradovatelným biopolymerem, který slouží nejen jako ochranný faktor, ale také jako postupně se uvolňující degradovatelná matrice „nosič“ oospor mikroorganismu *Pythium oligandrum*. Přípravek podle tohoto vynálezu je možno s výhodou použít k nátěru či nástřiku dřevěných konstrukcí, kdy dochází zároveň k účinné impregnaci dřeva olejovými komponentami přípravku. Přítomnost mikroorganismu zaručuje odolnost vůči plísním a houbovým chorobám a „defektům“ dřeva. Jako zcela nové použití je pak možno uvést použití pro účinnou konzervaci vzduchotechnických zařízení, klimatizační a chladicích jednotek. Pro snížení úrovně plísňové kontaminace v oblastech zasažených

povodněmi, ve vysušovaných oblastech a v okolí rekultivovaných vodních ploch se jeví výhodné použití přípravku speciálně vyvinutého pro tyto účely.

Citovaná literatura

- 5 1. Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, FeFloch G, Grizard D, Regnault–Roger C, Rey P (2014) Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*, Environ Sci Pollut Res 21, 4847–4860.
- 10 2. Drechsler C (1943) Several species of *Pythium* peculiar in their sexual development, Phytopathology 33, 261–299.
3. Deacon JW (1976) Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi, Trans Brit Mycol Soc 66, 383–391.
- 15 4. US 4259317. Veselý D, Hejdánek S. Preparation for the protection of emerging sugar beets against dumping–off, and method of its production.
5. US 4574083. Baker R, Lifshitz R, Isolates of *Pythium* species which are antagonistic to *Pythium ultimum*.
- 20 6. US 5961971, Martin FN, Biocontrol of fungal soilborne pathogens by *Pythium oligandrum*.
7. CZ 303908 B6, BIOPREPARÁTY. spol. s r.o. (Suchánek M.), Use of fungal organism *Pythium oligandrum*
- 25 8. CN 102807957 A, Liu X. a spol, Method for increasing *Phytophthora capsici* output and promoting oospore germination.
9. US 2014/0212387 A1, Luth P, Liquid preparation for biological plant protection, m
10. McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1990) Oospores of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* bulk–produced in liquid culture. Mycol Res 94, 613–616
- 35 11. McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1992) Effect of osmotic and matrix potential on growth and oospore germination of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. Mycol Res 96, 588–591.
12. Takenaka S, Ishikawa S (2013) Biocontrol of sugar beet seedlings and taproot diseases caused by *Aphanomyces cochlioides* by – *Pythium oligandrum* treatments before transplanting. JapAgric Res Quart 47, 75–83.
- 40 13. Etxeberria A, Mendarte S, Larregla S. (2011) Determination of viability of *Phytophthora capsici* oospores with the tetrazolium bromide staining test versus a plasmolysis method. Rev Iberoam Micol. 28, 43–49.
- 45 14. Verkaik M.I a spol. (2010) Oral biofilm models for mechanical plaque removal. Clin Oral Invest 14:403–409.
- 50 15. Wright D (2004) Use of sugars in cryopreserving human oocytes. Reprod Bio Med Online 9, 179–186.

PATENTOVÉ NÁROKY

55

1. Biologický protiplísňový kapalný prostředek s mikroorganismem *Pythium oligandrum*, s dlouhodobou stabilitou v řádu měsíců v podmínkách běžného skladování, **vyznačující se tím, že**
- 5 zahrnuje stabilizovanou suspenzi mikroorganismu *Pythium oligandrum*, a obsahuje
- 0,05 až 10,0 % hmotn. kultivační biomasy mikroorganismu *Pythium oligandrum* s obsahem kultivačního média, buněčných forem tohoto mikroorganismu a látek produkovaných tímto mikroorganismem a
- 10 90,0 až 99,95 % hmotn. stabilizátoru, kterým je alespoň jedna komponenta ze skupiny, zahrnující vodu, solný roztok, olej, roztoky osmolytů a glycerol, přičemž
- 15 v 1 ml tohoto biologického protiplísňového kapalného prostředku je, po běžné standardizaci, předem požadovaný počet dormantních oospor v rozsahu 1×10^3 až 2×10^7 ;
- nebo
- zahrnuje stabilizovanou suspenzi mikroorganismu *Pythium oligandrum*, a obsahuje
- 20 0,05 až 10,0 % hmotn. kultivační biomasy mikroorganismu *Pythium oligandrum* s obsahem kultivačního média, buněčných forem tohoto mikroorganismu a látek produkovaných tímto mikroorganismem,
- 25 79,77 až 99,95 % hmotn. stabilizátoru, kterým je alespoň jedna komponenta ze skupiny, zahrnující vodu, solný roztok, olej, roztoky osmolytů a glycerol, a případně
- zbytek do 100 % hmotn. nejméně jedné běžné modifikující/aplikační látky ze skupiny, zahrnující plnidlo, aroma, vitamin E, přičemž
- 30 v 1 ml tohoto biologického protiplísňového kapalného prostředku je, po běžné standardizaci, předem požadovaný počet dormantních oospor v rozsahu $2,5 \times 10^4$ až $1,0 \times 10^6$.
2. Biologický protiplísňový kapalný prostředek s mikroorganismem *Pythium oligandrum* podle
- 35 nároku 1, **vyznačující se tím, že**
- mikroorganismem *Pythium oligandrum* je kmen *Pythium oligandrum* Drechsler ATTC 38472, který byl deponován v České sbírce mikroorganismů (CCM) Masarykova Univerzita v Brně pod označením *Pythium oligandrum* M1.
- 40 3. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle některého nároku 1 až 2, **vyznačující se tím, že**
- stabilizovaná suspenze mikroorganismu *Pythium oligandrum* obsahuje stabilizátor na bázi vody v rozmezí 30,0 až 99,9 % hmotn.
- 45 4. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle nároku 3, **vyznačující se tím, že**
- stabilizátorem vodné suspenze je destilovaná voda nebo sterilizovaná destilovaná voda v množství 99,9 % hmotn.
5. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle nároku 3, **vyznačující se tím, že**
- 50 stabilizátorem vodné suspenze je solný roztok v množství 99,9 % hmotn.
6. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle nároku 3, **vyznačující se tím, že**
- stabilizátor vodné suspenze obsahuje vodu a osmolyt, a to
- vodu v množství 30 až 36 % hmotn. a
- 55 osmolyt ve formě sacharózy v množství 60 až 95 % hmotn.

7. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle některého nároku 1 až 2, **vyznačující se tím**, že stabilizovaná suspenze mikroorganismu *Pythium oligandrum* je bezvodá, stabilizátorem je alespoň jeden olej vybraný ze skupiny zahrnující parafinový olej, minerální olej, olivový olej a slunečnicový olej v množství 79,77 až 99,9 % hmotn.
8. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že bezvodá suspenze obsahuje jeden olej vybraný ze skupiny, zahrnující parafinový olej v množství 92,0 až 99,9 % hmotn. minerální olej v množství 99,9 % hmotn. olivový olej v množství 79,77 % hmotn. a slunečnicový olej v množství 92,0 % hmotn.
9. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že stabilizovaná suspenze mikroorganismu *Pythium oligandrum* je bezvodá a stabilizátorem je glycerol v množství 79,77 % hmotn.
10. Biologický protiplísňový kapalný prostředek podle některého z předcházejících nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že obsahuje, jakožto nosič oospor mikroorganismu *Pythium oligandrum*, 6,5 % hmotn. oxidu křemičitého nebo 16,0 % hmotn. postupně se uvolňující biodegradovatelnou matrici jako je polyvinylalkohol.
11. Způsob výroby biologického protiplísňového kapalného prostředku s mikroorganismem *Pythium oligandrum*, zahrnující stabilizovanou suspenzi mikroorganismu *Pythium oligandrum* podle některého z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že
- a) k aerobní kultivaci oomycety *Pythium oligandrum* v kapalně fázi se použije kapalně médium obsahující extrakt z obilovin, třtinovou melasu a další nezbytně živiny, kapalně médium se sterilizuje,
- b) po vychladnutí se zaočkuje jedním z vybraných kmenů *Pythium oligandrum*,
- c) po skončení kultivace se biomasa sklídí a zpracuje,
- d) následně po ukončení kultivační fáze *Pythium oligandrum* v kapalně fázi se biomasa s kapalně médiem homogenizuje, aby velikost minimálně 95 % částic v suspenzi byla v rozmezí 0,050 až 0,300 mm, s výhodou v rozmezí 0,050 až 0,125 mm a
- f) získaná homogenní suspenze, charakterizovaná počtem oospor, se podle počtu oospor následnou běžnou standardizací – zkoncentruje nebo zředí – na předem požadovanou koncentraci oospor daného biologického protiplísňového kapalného prostředku.
12. Způsob výroby biologického protiplísňového kapalného prostředku s mikroorganismem *Pythium oligandrum*, zahrnující stabilizovanou suspenzi mikroorganismu *Pythium oligandrum* podle některého z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že
- g) pro kultivaci mikroorganismu *Pythium oligandrum* na pevně substrátu se připraví médium obsahující zrna obilnin, výhodně loupáně obilky prosa, např. *Panicum miliaceum* L., které se smíchají s podílem živněho kapalného média,
- h) médium se v kultivačních nádobách sterilizuje,
- i) po vychladnutí se médium naočkuje jedním z vybraných kmenů *Pythium oligandrum*, po skončení procesu kultivace se sklizená biomasa dále zpracuje do formy suspenzního koncentrátu,

5 k) po ukončení kultivační fáze *Pythium oligandrum* na pevném substrátu se biomasa homogenizuje, v odpovídajícím objemu demineralizované vody tak, aby výsledná velikost minimálně 95 % částic v suspenzi byla v rozmezí 0,050 až 0,300 mm, s výhodou v rozmezí 0,050 až 0,125 mm a

10 l) získaná homogenní suspenze, charakterizovaná počtem oospor, se podle počtu oospor následnou běžnou standardizací – zkoncentruje nebo zředí – na předem požadovanou koncentraci oospor vhodnou k přípravě daného biologického protiplísňového kapalného prostředku.

13. Způsob výroby biologického protiplísňového kapalného prostředku s mikroorganismem *Pythium oligandrum* podle některého z nároků 11 nebo 12, **vyznačující se tím**, že

15 m) pro bezvodou suspenzi mikroorganismu *Pythium oligandrum* se po ukončení kultivační fáze na pevném substrátu nebo v kapalně fázi získaný materiál homogenizuje, aby výsledná velikost minimálně 95 % částic v suspenzi byla 0,050 až 0,300 mm, s výhodou v rozmezí 0,050 až 0,125 mm,

20 n) získaná homogenní suspenze, charakterizovaná počtem oospor, se následně odstředí

o) a odstředěný materiál se po odstranění supernatantu následnou běžnou standardizací doplní olejem nebo glycerolem na předem požadovanou koncentraci oospor vhodnou k přípravě daného biologického protiplísňového kapalného prostředku,

25 p) následně se získaný materiál resuspenduje.

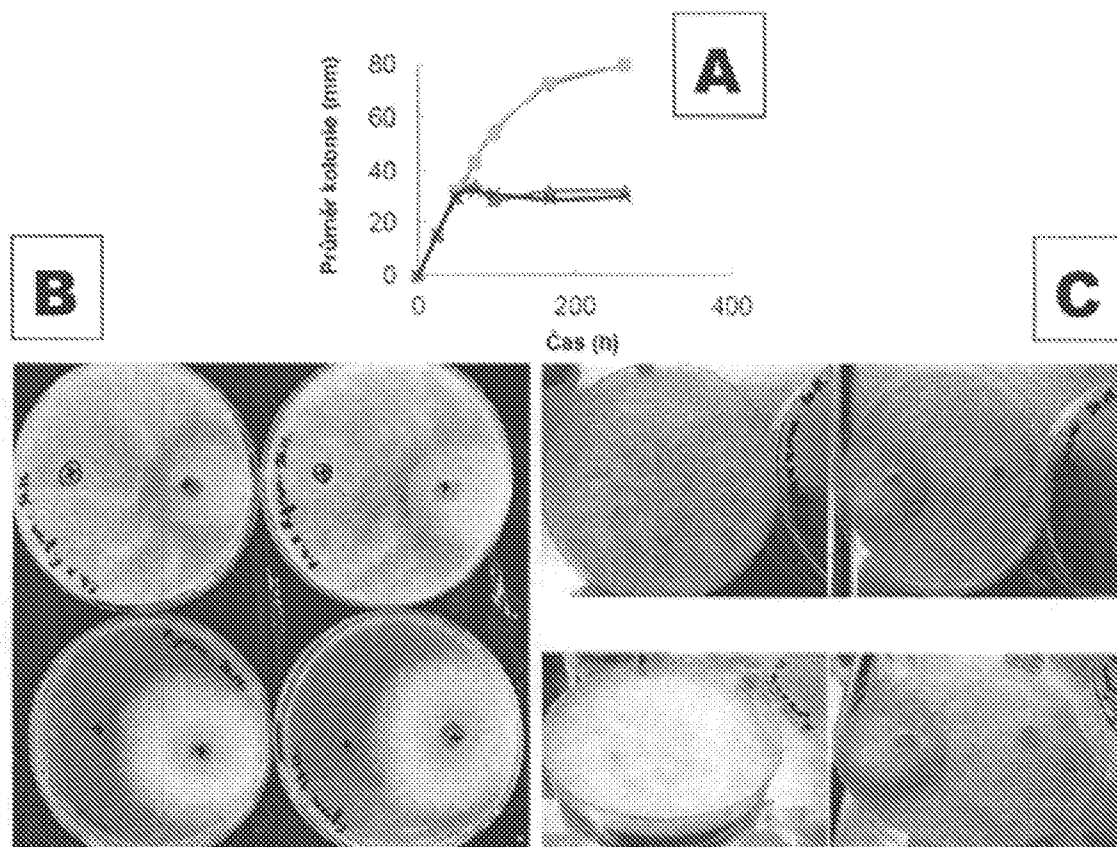
14. Způsob výroby biologického protiplísňového kapalného prostředku s mikroorganismem *Pythium oligandrum* podle některého z nároků 11 až 13, **vyznačující se tím**, že

30 k zajištění maximální přípustné velikosti částic mikroorganismu *Pythium oligandrum* v daném rozmezí 0,050 až 0,300 mm, s výhodou 0,050 až 0,125 mm, se suspenze po homogenizaci separuje, např. filtruje na předem danou velikost částic a následnou běžnou standardizací se suspenze zkoncentruje nebo naředí.

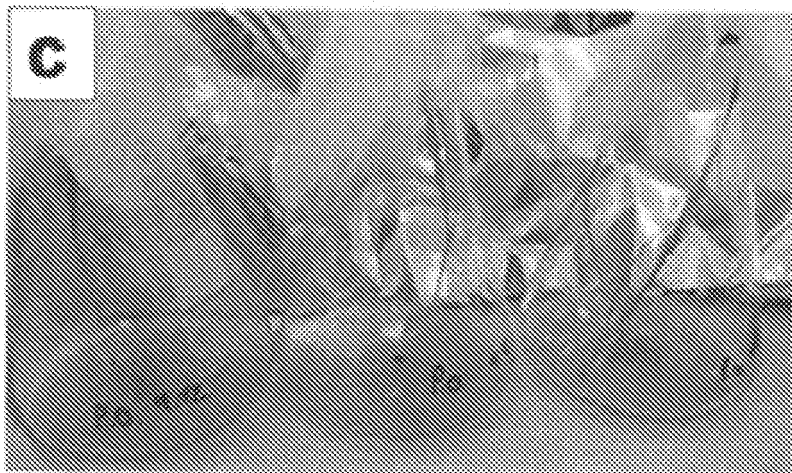
35 15. Způsob výroby podle některého z nároků 11 až 14, **vyznačující se tím**, že vodná suspenze se při homogenizaci stabilizuje běžnou standardizací přidavkem osmolytů a v kombinaci s uchováváním při teplotách nižších než 8 °C se skladuje ve sterilních velkoobjemových nádobách.

4 výkresy

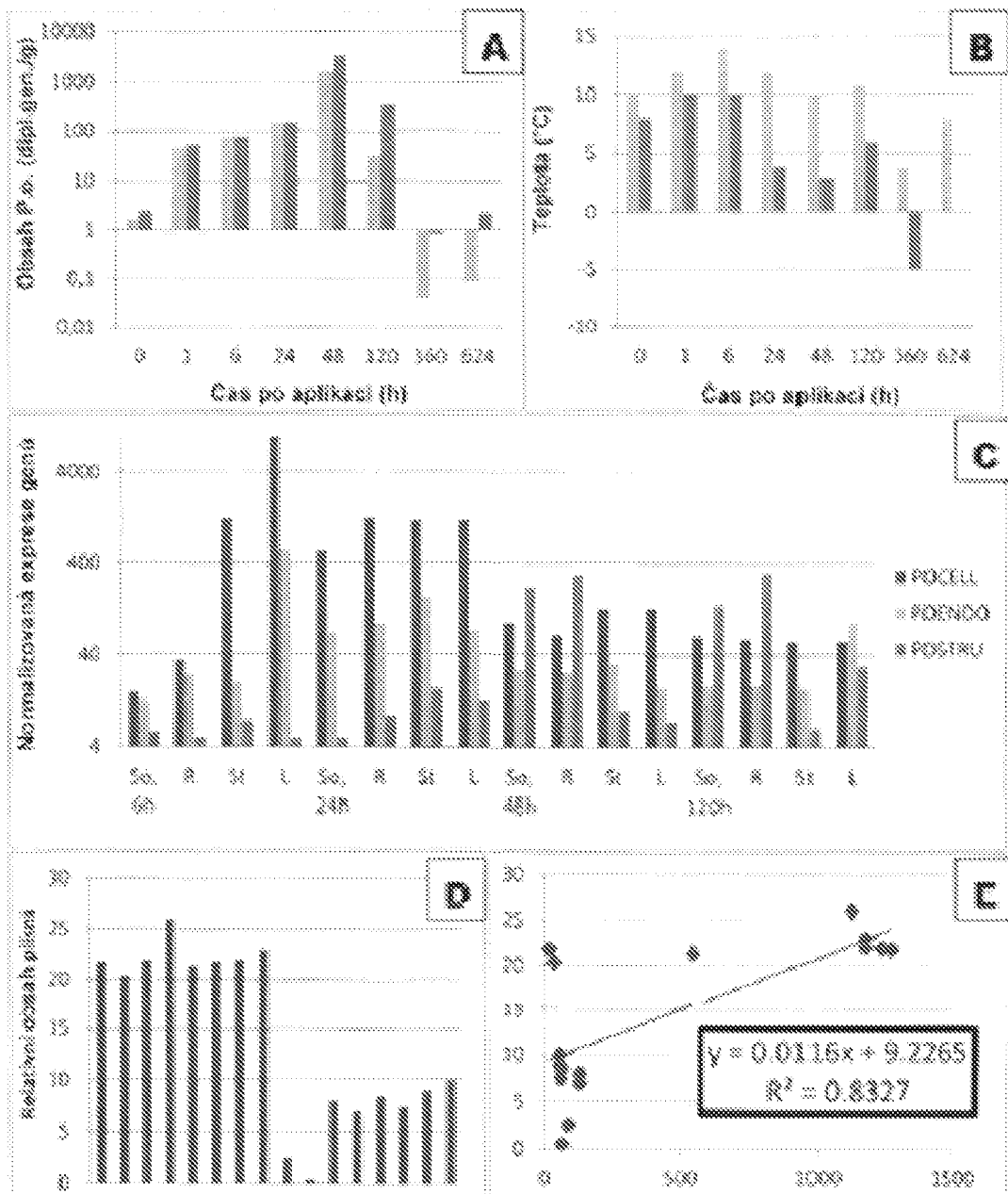
40



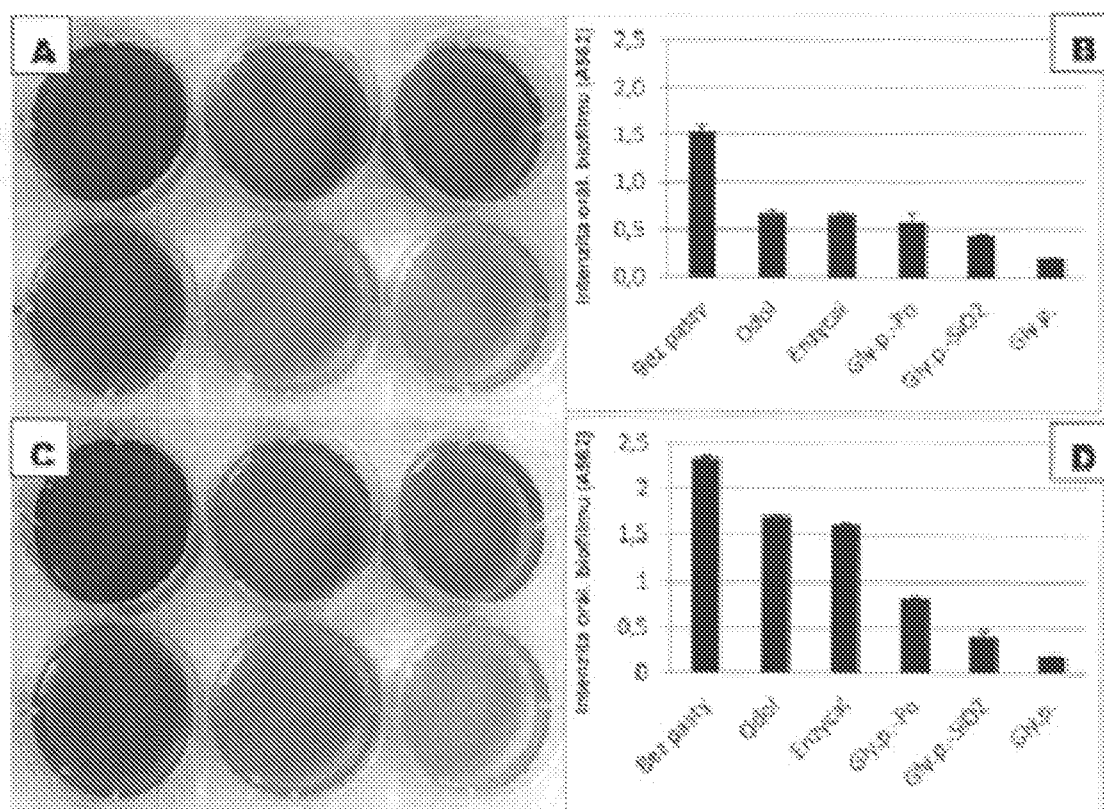
Obr. 1A, 1B, 1C



Obr. 2A, 2B, 2C



Obr. 3A, 3B, 3C



Obr. 4A, 4B, 4C