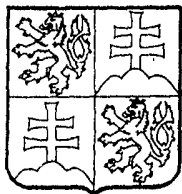


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

27 1 587

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
A 01 N 63/00

(21) PV 1730-88.G

(22) Přihlášeno 17 03 88

(40) Zveřejněno 12 02 90

(45) Vydáno 02 09 91

(75) Autor vynálezu BERÁNEK JAROMÍR MVDr. CSc.,
BERÁNEK IVO, BRNO

(54)

Prostředek k preventivní biologické ochraně
semen rostlin, bulevnin a krmiv s fungista-
tickým a fungicidním účinkem

(57) Prostředek k preventivní biologické
ochraně semen, bulev, nadzemních částí
rostlin a krmiv obsahující mikroorganismy
Bacillus subtilis, číslo sbírkového kmene
IBE 710, vhodný k aplikaci jako antagonis-
ta patogenních mikroorganismů k ochraně
uvedených druhů materiálů.

Vynález se týká prostředku k preventivní biologické ochraně semen rostlin, bulev rostlin a krmiv obsahující mikroorganismy *Bacillus subtilis* číslo sbírkového kmene IBE 710 a jeho metabolity, uloženého ve sbírce kmenů Státního veterinárního ústavu v Brně, Mercova č. 54.

Uvedený mikroorganismus *Bacillus subtilis* číslo sbírkového kmene IBE 710 produkuje metabolity enzymatického charakteru ze skupiny alkalických proteáz subtilosiny, D, D karboxilázu a jiné metabolity pro makroorganismy rostlin, lidské i zvířecí populace netoxické, které vykazují širokospektrální účinky mikrobicidní nebo mikrobistatické, zejména však fungicidní nebo fungistatické, na houbové mikroorganismy tříd Archimycetes, Phycomycetes, Ascomycetes a Basidiomycetes, eventuálně i virocidní účinky u některých druhů virů, kterých lze využít k preventivní biologické ochraně semen rostlin, bulev rostlin a krmiv za účelem eliminovat negativní dopad těchto vrhů mikroorganismů na uvedené druhy finálních rostlinných produktů v průběhu jejich skladování.

V současné době v důsledku intenzivního sběru semen rostlin a bulev rostlin, eventuálně i nadzemních částí rostlin, ke krmným účelům v rámci realizované mechanizace často i za méně příznivých podmínek jejich skladování dochází k nežádoucím skutečnostem, že totiž zejména houbové mikroorganismy nalézají za těchto složitých podmínek vhodné podmínky pro svůj růst a vývoj a často i pro produkci toxických metabolitů. Z pohledu perspektivního rozvoje zemědělské výroby a tvorby životního prostředí pro lidskou a zvířecí populaci vzniká takto i potenciální nebezpečí vedoucí ke znehodnocení těchto finálních produktů rostlinného původu a z pohledu preventivní toxikologie vzniká nebezpečí nahromadění toxických metabolitů v uvedených materiálech a po jejich konzumaci zvířaty i nebezpečí vzniku mykotoxikóz. Proto také v posledních letech řada ověřovacích prací je zaměřena na účinnou prevenci mykóz jako potenciálního nebezpečí pro lidskou i zvířecí populaci, která je zaměřena na problematiku produkce rostlinných produktů, ale zejména na problematiku jejich skladování.

Pro uvedené záměry prevence a ochrany rostlin i finálních produktů rostlinného původu před negativními účinky zejména houbových mikroorganismů jsou v současné době používány různé způsoby a druhy ochrany fyzikálního, nebo chemického charakteru, jako je sušení pomocí horkovzdušných sušáren, používání chemických látek syntetického původu vykazující mikrobistatické účinky.

Pro účely přehledu existujících ochranných látek chemického charakteru, které lze použít k preventivní ochraně rostlin nebo v průběhu konzervace finálních produktů rostlinného původu, vydává Federální ministerstvo zemědělství ČSSR seznam povolených přípravků na ochranu rostlin tuzemského původu i přípravků importovaných. Uvedené druhy přípravků k preventivní ochraně rostlin, nebo používaných ke konzervaci krmiv ani způsoby jejich použití nejsou však totožné s prostředkem podle vynálezu.

Biologické způsoby ochrany rostlin v průběhu vegetačního období a prováděné biologické způsoby ochrany finálních produktů rostlinného původu jsou v prvopočátku jejich epochy. Ve světové literatuře jsou uvedeny způsoby biologické ochrany rostlin nebo finálních rostlinných produktů s použitím několika druhů mikroorganismů, vykazující antagonický účinek zejména na houbové mikroorganismy. Týkají se např. použití houbového mikroorganismu *Trichoderma harsianum* proti kořenomorce bramborové způsobované fytopatogenním houbovým mikroorganismem *Rhizoctonia solani*, eventuálně v součinnosti s jiným druhem houbového mikroorganismu *Fusarium solani*.

Dále byl pro rámec preventivní biologické ochrany použit mikroorganismus *Corticium species* proti houbovému mikroorganismu *Pythium ultimum*, který způsobuje onemocnění červené řepy. Mikroorganismus *Trichoderma harsianum* byl dále použit i proti fytopatogennímu houbovému mikroorganismu *Pythium species* a *Verticillium species*, který

způsobuje onemocnění rostlin i degradaci finálních produktů rostlinného původu. Rovněž ani pro tyto uvedené způsoby preventivní biologické ochrany jsme v dostupných podkladech Úřadu pro vynálezy v Praze nenalezli žádná vydaná Autorská osvědčení a uvedené způsoby ochrany nejsou totožné s použitím prostředku k preventivní biologické ochraně podle vynálezu.

Biologické preventivní způsoby ochrany řepy proti spále řepy v průběhu vegetačního období řešil Veselý, Daša, číslo autorského osvědčení Úřadu pro vynálezy a objevy v Praze 199 906, přičemž využil antagonických účinků méně patogenního kmene houbového mikroorganismu *Pythium oligardum*. V tomto směru bylo vydáno ještě další autorské osvědčení Úřadu pro vynálezy a objevy v Praze číslo 204 208 a autorské osvědčení číslo 213 639 týkající se výroby a použití přípravku obsahujícího mikroorganismy *Pythium oligardum*. Rovněž tyto uvedené způsoby biologické ochrany řepy v průběhu jejího vegetačního období ani způsob výroby prostředku nejsou totožné se způsoby prostředku a jeho aplikační formou podle vynálezu. Jiná sdělení týkající se způsobu biologické ochrany rostlin nebo finálních rostlinných produktů jsme v dostupných podkladech Úřadu pro vynálezy a objevy v Praze nenalezli.

Způsoby biologické ochrany finálních produktů rostlinného původu, např. silážování nebo senážování, sledují především tvorbu organických kyselin v průběhu fermentačního procesu z dostupných cukrů činností mikroorganismů laktobacilů a jiných druhů. K těmto způsobům byly například použity mikrobiologické zákysy - Fryš, František a kolektiv, číslo autorského osvědčení Úřadu pro vynálezy a objevy v Praze 209 136, dále Mičan, Petr použil v rámci fermentačního procesu mikroorganismu *Streptococcus fecium*, číslo autorského osvědčení 205 734 a číslo autorského osvědčení 225 458 a číslo autorského osvědčení 207 829. Uvedené způsoby biologické ochrany mají zcela jiný charakter než způsoby s použitím prostředku podle vynálezu a nejsou s nimi totožné.

Současné nedokonalé způsoby biologické ochrany rostlin a zejména biologické nedokonalé způsoby ochrany finálních rostlinných produktů nebo krmiv - pokud vůbec existují - jsou odstraněny výrobou a použitím prostředku podle vynálezu, který obsahuje v 1,00 g hmotnosti alespoň 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710 a jeho metabolity, vykazující širokospektrální mikrobiostatické a mikrobicidní účinky, zejména fungistatické a fungicidní účinky na saprofytní a patogenní mikroorganismy, přičemž pro makroorganismy rostlin, organismy lidské i zvířecí populace jsou tyto metabolity netoxické.

Způsob výroby prostředku obsahující mikroorganismy *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, a jeho netoxické metabolity je založen na výrobě tekuté kultury s použitím tekuté pomnožovací půdy vyrobené tak, že se do sterilní skleněné nádoby nebo fermentoru o obsahu 2 000 ml naváží 18,00 až 22,00 g peptonu, 9,00 až 11,00 g laktosy nebo sorbitu, 0,90 až 1,10 g calcium glycerin fosfátu nebo calcium gluconciem, 0,90 až 1,10 g chloridu sodného, doplní se destilovanou vodou nebo odstředěným mlékem (kravským) do obsahu 1 000 mililitrů, upraví se hydroxidem draselným nebo sodným pH reakce na 7,00 až 7,4 a provede se sterilizace při teplotě + 120 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení tekuté sterilní pomnožovací živné půdy na teplotu + 37 až 38 °C se provede inokulace mikroorganismem *Bacillus subtilis* číslo sbírkového kmene IBE 710 v celkovém množství alespoň 10^{+9} na 1 000 mililitrů tekuté, pomnožovací živné půdy a dále inkubace v termostatu nebo ve fermentoru s použitím teploty + 37 až 38 °C po dobu 72 hodin, kdy dojde k optimálnímu pomnožení uvedeného druhu a kmene mikroorganismu tak, že 1,00 g tekuté kultury obsahuje alespoň $10,00^{+9}$ mikroorganismů.

Tímto způsobem vyrobené tekuté kultury mikroorganismu *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, obsahující i jeho metabolity vykazující fungistatické,

fungicidní a mikrobistatické a mikrobicidní účinky, zejména na fytopatogenní mikroorganismy, může být použito ve stanoveném množství, formou jemného postřiku k preventivní biologické ochraně semen rostlin, bulev rostlin, nadzemních částí rostlin, eventuálně krmiv jako mikrobistatického, či mikrobicidního prostředku, eliminujícího negativní účinky mikroorganismů.

V případě, že nebude tekutá kultura mikroorganismu *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, použita k jemnému postřiku v rámci preventivní biologické ochrany, lze ji lyofilizovat nebo usušit za sterilních podmínek spolu s adsorbční sypkou látkou tak, aby konečný produkt obsahoval alespoň 90 až 92 procent sušiny, pomlet ho a egalizovat s vhodným vehikulem tak, aby finální prostředek obsahoval v 1,00 g hmotnosti alespoň 10^{+9} mikroorganismů a bylo ho možné použít jako sypký prostředek k preventivní biologické ochraně ve stanoveném množství.

Příklad 1

Do skleněné nádoby nebo fermentoru o obsahu 2 000 ml bylo naváženo:

peptonu	1,80 až 2,20 % hmotnostních
laktosy nebo sorbitu	0,90 až 1,10 % hmotnostních
calcium glycerin fosfátu	
nebo calcium gluconicum	0,09 až 0,11 % hmotnostních
chloridu sodného	0,09 až 0,11 % hmotnostních
destilované vody ad	100 % hmotnostních

Po rozpuštění komponentů se obsah zhomogenizoval, upravila se pH reakce tekuté živné půdy, provedla se její sterilizace s použitím teploty $+120^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut a takto vyrobená a sterilní tekutá živná půda se po jejím ochlazení na teplotu $+37$ až 38°C inokulovala mikroorganismem *Bacillus subtilis* v celkovém množství alespoň 10^{+9} mikroorganismů na 1 000 ml tekuté živné půdy a provedla se dále inkubace při teplotě $+37$ až 38°C po dobu 72 hodin, kdy došlo k optimálnímu pomnožení uvedeného mikroorganismu tak, že 1,00 g tekuté kultury obsahoval minimálně 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, a jeho metabolity.

Způsobem výroby byla získána tekutá kultura obsahující v 1,00 g hmotnosti 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, a jeho netoxické metabolity a bylo ji možné použít ve stanoveném množství po homogenizaci buď samotnou, nebo smísenou s pitnou vodou neobsahující volný chlór, případně s jiným vehikulem k jemnému postřiku semen rostlin, bulev rostlin, nadzemních částí rostlin nebo krmiv v rámci biologické preventivní ochrany proti negativním účinkům patogenních nebo saprofytních mikroorganismů. V případě jejího nepoužití k postřiku bylo ji lze lyofilizovat nebo smísit s adsorbční sypkou látkou organického nebo anorganického původu a usušit při teplotě $+37$ až 38°C , až celkové množství sušiny činilo 90 až 92 % hmotnosti, dále pomlet tak, až jako sypký prostředek propadl zcela sítem o hraně oka 0,2 mm, eventuálně egalizovat, aby v 1,00 g hmotnosti prostředku k ochraně semen, bulev a nadzemních částí rostlin nebo krmiv bylo alespoň 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710 a jeho metabolity. Takto vyrobený prostředek k biologické ochraně semen, bulev a nadzemních částí rostlin proti negativním účinkům mikroorganismů bylo možné použít tam, kde nebylo možné použít k biologické ochraně jemný postřik tekutou kulturou.

Příklad 2

Do sterilní skleněné nádoby nebo fermentoru o obsahu 2 000 mililitrů bylo naváženo:

peptonu	1,80 až 2,20 % hmotnostních
laktosu nebo sorbitu	0,90 až 1,10 % hmotnostních
calcium glycerin fosfátu	
nebo calcium gluconicum	0,09 až 0,11 % hmotnostních
chloridu sodného	0,09 až 0,11 % hmotnostních
odstředěného kravského mléka	ad
	100 % hmotnostních

Po rozpuštění komponentů se obsah důkladně zhomogenizoval, upravila se pH reakce na 7,00 až 7,4, provedla se sterilizace při použití teploty +120 °C po dobu 30 minut a takto vyrobená tekutá živná půda se po jejím ochlazení na teplotu +37 až 38 °C inokulovala mikroorganismem *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, v celkovém množství alespoň 10^{+9} mikroorganismů na 1 000 mililitrů tekuté pomnožovací živné půdy, dále se provedla inkubace při teplotě +37 až 38 °C po dobu 72 hodin, kdy došlo k optimálnímu pomnožení mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, tak, že tekutá kultura obsahovala v 1,00 g hmotnosti alespoň 10^{+9} mikroorganismů.

Takto vyrobenou tekutou kulturu mikroorganismu *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, bylo možné použít v rámci preventivní biologické ochrany semen, bulev, nadzemních částí rostlin a krmiv formou jemného postřiku kultury nebo smísenou spolu s pitnou vodou proti negativním účinkům mikroorganismů. V případě, že nebyla použita tekutá kultura jako prostředek k ochraně semen, bulev, nadzemních částí rostlin nebo krmiv formou jemného postřiku, bylo ji možné lyofilizovat nebo usušit spolu se sterilní sypkou absorpční látkou při teplotě +37 až 38 °C tak, až celkové množství sušiny činilo 90 až 92 % hmotnostních, dále pomlet, až jako sypký prostředek propadl zcela sítem o hraně oka 0,2 mm, případně egalizovat tak, aby v 1,00 g hmotnosti prostředku k biologické ochraně bylo alespoň 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, a jeho metabolity a bylo ho možné použít k preventivní biologické ochraně semen, bulev, nadzemních částí rostlin a krmiv všude tam, kde nebylo vhodné použít jemný postřik tekutou kulturou.

Příklad 3

Do sterilní skleněné nádoby nebo fermentoru o obsahu 2 000 mililitrů bylo naváženo:

peptonu	1,80 až 2,20 % hmotnostních
calcium glycerin fosfátu	
nebo calcium gluconicum	0,09 až 0,11 % hmotnostních
sušeného odstředěného mléka	30,00 až 33,00 % hmotnostních
destilované vody	ad
	100,00 % hmotnostních

Po rozpuštění uvedených druhů komponentů se obsah důkladně zhomogenizoval, upravila se pH reakce na 7,00 až 7,4, provedla se sterilizace při použití teploty +120 °C po dobu 30 minut a takto vyrobená tekutá pomnožovací živná půda se po jejím ochlazení na teplotu +37 až 38 °C inokulovala mikroorganismem *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, v celkovém množství 10^{+9} minimálně cel. počtu mikroorganismů na 1 000 mililitrů tekuté živné půdy, dále se provedla inkubace při teplotě +37 až 38 °C po dobu 72 hodin, kdy došlo k optimálnímu pomnožení uvedeného druhu mikroorganismů tak, že 1,00 g tekuté kultury obsahoval alespoň 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710.

Takto vyrobenou tekutou kulturu mikroorganismu *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, bylo možné použít ve stanoveném množství smísenou s pitnou vodou neobsahující volný chlór k jemnému postřiku semen, bulev, nadzemních částí rostlin a krmiv

v rámci preventivní biologické ochrany před negativním účinkem zejména houbových mikroorganismů.

V případě jejího nepoužití k jemnému postřiku, bylo možné a také ji bylo použito k lyofilizaci nebo k usušení spolu se sterilní absorbční látkou organického nebo anorganického původu při použití teploty +37 až 38 °C, až celkové množství sušiny činilo 90 až 92 % hmotnostních, načež bylo provedeno pomletí lyofilizátu nebo sušeného prostředku tak, aby jako sypký propadl zcela sítím o hraně oka 2,00 mm, dále byla provedena egalizace tak, aby prostředek obsahoval v 1,00 g hmotnosti alespoň 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, a jeho metabolity a prostředku mohlo být použito k preventivní biologické ochraně semen, bulev, nadzemních částí rostlin a krmiv ve stanovených dávkách proti negativním účinkům zejména houbových mikroorganismů v případech, kdy nebylo možné použít jemného postřiku tekuté, případně egalizované kultury uvedeného mikroorganismu.

K testaci fungistatických a fungicidních účinků byly použity jednotlivé druhy semen rostlin a krmiv v množství 500 g jeden vzorek, a to jak pokusný, tak kontrolní.

Uvedené druhy semen rostlin a krmiv byly vloženy v uvedeném množství do samostatných skleněných lahví označených pořadovými čísly a datem zahájení ověřovacích prací a testací.

Ke každému vzorku pokusné skupiny semen rostlin nebo krmiv bylo přimíseno 0,5 g prostředku k biologické ochraně semen rostlin, bulev rostlin a krmiv obsahující v 1,00 g hmotnosti alespoň 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710, a jeho metabolity absorbovaných na křemelině. Prostředek byl sypké, pudrovité konsistence. Obsah vzorků pokusné skupiny byl dále spolu s prostředkem k biologické ochraně po provedeném navážení důkladně zhomogenizován, až dokonale ulpěl na semenech rostlin. Po provedené homogenizaci vzorkovnice pokusné skupiny vzorků byly uzavřeny. Ke vzorkům semen rostlin a krmiv kontrolní skupiny nebyl proveden žádný přídavek protektivní látky a vzorkovnice byly rovněž uzavřeny skleněnou zátkou.

Skladování vzorků semen rostlin a krmiv ve skleněných lahvích (prachovnicích) bylo provedeno v laboratorních podmínkách - jak pokusná, tak i kontrolní skupina vzorků po dobu jednoho roku. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka č. 1

Sledování fungistatických a fungicidních účinků prostředku určeného k preventivní biologické ochraně semen rostlin, bulevnin a krmiv obsahujícího mikroorganismus *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710 - (aplikováno 1,00 g prostředku na 1,0 kg materiálu)

Druh ošetř. mate- riálu	Mykolo- gický nález	Pokusná skupina vzorků intenzita růstu				Kontrolní skupina vzorků intenzita růstu			
		1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
pšenice	Mucor sp. Asp. spec.	+	+	+	+	++	++	++	+++
žito	Rhiz. nig. Penic. sp.	+	+	+	+	++	+++	+++	+++
oves	Rhiz. nig. Asper. fum.	+	-	+	+	++	+++	+++	+++
ječmen	Alter. al. Clad. Herb.	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
kukuřice	Mucor sp. Pen. sp.	+	+	+	+	++	++	++	++
hrách žlutý	Muc. sp. Asper. nig.	+	+	+	+	++	++	++	++
bob konský	Pen. sp. Alt. al.	-	-	-	-	++	++	++	++
krmná směs BR	Asper. fum. Muc. sp.	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
krmná směs ČOS	Asp. fum. Rhiz. nig.	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
semeno prosa	Pen. sp. Alt. alt.	-	-	-	-	++	++	++	++
semeno vojtěšky	Clad. her. Pen. sp.	-	-	-	-	++	++	++	++
semeno lnu	Pen. sp. Clad. her.	-	-	-	-	++	++	+++	+++
suš. škvar- kovina	Monascus. Rub. Asp. nig.	+	+	-	-	++	++	+++	+++

+ = velmi slabý porost (+ -)

++ = střed. sil. porost

+++ = sil. porost

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Prostředek k preventivní biologické ochraně semen, bulev a nadzemních částí rostlin včetně krmiv, vyznačený tím, že v 1,00 g hmotnosti obsahuje alespoň 10^{+9} mikroorganismů *Bacillus subtilis*, číslo sbírkového kmene IBE 710 a jeho metabolity.