

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 308 145

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*A01N 65/22* (2009.01)  
*A01N 25/28* (2006.01)  
*A01P 3/00* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-819**  
(22) Přihlášeno: **21.12.2016**  
(40) Zveřejněno: **11.07.2018**  
**(Věstník č. 28/2018)**  
(47) Uděleno: **11.12.2019**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.01.2020**  
**(Věstník č. 4/2020)**

(56) Relevantní dokumenty:

GÓMEZ-ESTACA, J., et al. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 2010, 27.7: 889-896.; PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. F. Production of microparticles with gelatin and chitosan. *Carbohydrate polymers*, 2015, 116: 292-299.; MARTINS, Isabel Maria Duque. Microencapsulation of Thyme Oil by Coacervation: Production, Characterization and Release Evaluation. 2012. PhD Thesis. Universidade do Porto (Portugal)..  
US 2007042184 A; WO 2017106944 A.

(73) Majitel patentu:

Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž, CZ  
Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 6 -  
Suchbát, CZ

(72) Původce:

Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D., Kroměříž, CZ  
Ing. Marie Maňasová, Ph.D., Kašperské Hory, CZ  
Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D., Praha 9 - Černý Most,  
CZ

(74) Zástupce:

PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,  
Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

(54) Název vynálezu:

**Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na  
základě esenciálního oleje z *Thymus  
vulgaris*, způsob jeho výroby a použití**

(57) Anotace:

Řešení se týká fungicidního prostředku na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, které je charakterizováno tím, že obsahuje stabilní formu esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* v podobě mikrokapiček esenciálního oleje, které jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan v poměru 3:10, kdy ve 100 ml fungicidního prostředku je obsaženo 0,5 až 1,5 ml esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, 9,5 až 8,5 ml řepkového oleje na ředění esenciálního oleje, 0,2 ml polyethylenglykol sorbitanu monooleátu, 13,3 ml biopolymeru tvořícího obal mikrokapiček a 76,5 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného.

## Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, způsob jeho výroby a použití

### 5 Oblast techniky

Řešení se týká fungicidního prostředku na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, způsob jeho výroby a použití. Fungicidní prostředek je ve formě mikročastic esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, které umožňují jeho využití v ochraně rostlin, respektive obilnin, proti houbovým chorobám, kdy obal mikročastic chrání esenciální olej proti odpaření a umožňuje tak prodloužení jeho účinnosti. Dále je optimalizována koncentrace esenciálního oleje v mikročasticích i v postřikové jíše tak, aby nedocházelo k poškození rostlin vlivem fytotoxicity.

### 15 Dosavadní stav techniky

Účinky esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* jsou popsány zejména proti houbovým a bakteriálním patogenům v humánní medicíně, rovněž jsou používány vodné či etanolové extrakty z této rostliny v potravinářském průmyslu, a to jako ochrana potravin proti poškození skládkovými chorobami.

Účinek oleje z *Thymus vulgaris* na houbové patogeny obilovin rostlin byl již v minulosti popsán (Matusínský, P., Zouhar, M., Pavela, R., Nový, P. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of Cereal. Industrial Crops and Products, 67, 2015, 208-215), dosud ovšem byly esenciální oleje používány ve formulacích, které neumožňovaly déletrvající účinek po aplikaci vzhledem k jejich těkavosti. Dále podléhaly rychlému rozložení vlivem klimatických podmínek, zejména slunečního záření.

V procesu ochrany obilnin proti houbovým chorobám je uplatňována celá řada preventivních, ale zejména pak kurativních metod ochrany rostlin v čele s aplikací fungicidních látek, a to jak kontaktních, tak systémových. Z hlediska měnící se legislativy dochází k vytváření podmínek pro aplikaci alternativních prostředků ochrany rostlin, a to zejména v integrovaných systémech produkce obilovin. Používání fungicidů sebou pochopitelně nese i reziduální zátěž potravinového řetězce a zdrojů pitné vody. Významný je mimo jiné kumulativní efekt reziduí pesticidů, kdy jednotlivé pesticidy v potravině nepřesahují stanovený limit, ale kumulace všech obsažených reziduí představuje zdravotní riziko. Vědecké studie poukazují na rizika spojená s vyšším výskytem nádorových onemocnění, alergií, narušení hormonální rovnováhy a reprodukčních poruch v populaci. Dalším významným problémem spojeným s používáním syntetických pesticidů je vznik rezistence patogenů k těmto přípravkům.

### Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje stabilní formu esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* v podobě mikrokapiček esenciálního oleje, které jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan v poměru 3:10, kdy ve 100 ml fungicidního prostředku je obsaženo 0,5 až 1,5 ml esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, 9,5 až 8,5 ml řepkového oleje na ředění esenciálního oleje, 0,2 ml polyethylenglykol sorbitanu monooleátu, 13,3 ml biopolymeru tvořícího obal mikrokapiček a 76,5 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného.

Podstata vynálezu dále spočívá ve výrobě fungicidního prostředku, kdy do nádoby se nalije 15 ml 10% hmotn. esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného v řepkovém oleji, k němuž se přidává 300 µl přípravku polyethylenglykol sorbitanu monooleátu a tato směs se emulguje pomocí

homogenizátoru při 18 000 až 22 000 rpm po dobu 3 minut, dále se přidává 20 ml biopolymeru želatiny a chitosanu a směs se emulguje při 20 000 rpm po dobu 3 minut, pak se připravená emulze pomalu vlévá do jiné nádoby obsahující 114,7 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného o hodnotě pH 5,0 a to při 18 000 až 22 000 rpm a následně promíchává ještě další 3  
5 minuty za vzniku stabilního fungicidního prostředku.

Použití fungicidního prostředku na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* jako ochrana rostlin proti houbovým patogenům *Pyrenophora teres*, *Blumeria graminis* a *Fusarium culmorum* pro potřeby ekologických a integrovaných systémů pěstování obilnin je  
10 také podstatou vynálezu, přičemž na 1 ha rostlin se použije 200 až 400 l fungicidního prostředku.

Aplikace fungicidního prostředku podle vynálezu umožňuje omezit negativní vliv napadení rostlin houbovými patogeny, a to s ohledem na dobrý zdravotní stav ošetřených rostlin a  
15 fytoxicitu. Fungicidní prostředek byl optimalizován i z hlediska retence v čase, respektive doby, po kterou je účinnost prokazatelná a rovněž z pohledu fytoxicity nové formulace. Esenciální olej je formulován ve třech fázích. V první fázi je připravena emulze 10% esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného pomocí řepkového oleje pomocí mísení při 20 000  
20 otáčkách za minutu pomocí homogenizátoru po dobu 3 minut. Ve druhé fázi jsou pak vzniklé mikrokapičky o velikosti 20 až 40 µm obaleny biopolymerem sestaveného z želatiny a chitosanu. Želatinu 8 g/200 ml je nutné nejprve rozpustit v destilované vodě pomocí magnetické míchačky  
25 vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za minutu pomocí teflonového magnetického míchadla, dále je do želatiny přimíchán sorbitol v množství 0,15 g/g želatiny a rovněž pak glycerol v množství 0,15 ml/g želatiny. Takto připravenou směs je nutné míchat až do  
kompletního rozpuštění všech komponent, a to pomocí magnetické míchačky vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za minutu pomocí teflonového magnetického míchadla.

Chitosan 2 g/60 ml je nutné nejprve rozpustit v 0,15M kyselině octové a pomocí magnetické  
30 míchačky vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za minutu pomocí teflonového magnetického míchadla.

V dalším kroku je nutné připravit biopolymer, a to smísením rozpuštěné želatiny a chitosanu  
v poměru 3:10 pomocí magnetické míchačky vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za  
minutu pomocí teflonového magnetického míchadla.

Takto připravený fungicidní prostředek podle vynálezu je pak použitelný pro ochranu rostlin proti  
35 výše uvedeným patogenům.

Vzhledem k výše uvedeným aspektům v dosavadním popisu techniky a integraci produkce  
40 obilovin je nezbytně nutné vytvářet nové prostředky ochrany rostlin pro integrované a ekologické způsoby produkce zemědělských komodit. Průmyslová využitelnost je tedy společensky žádaná a je tedy dobrý předpoklad pro extrapolaci těchto prostředků do praxe. Tento vynález je určen zejména pro organizace činné ve výrobě a uvádění na trh nových podpůrných látek v oboru ochrana a pěstování rostlin. Nový fungicidní prostředek podle vynálezu umožní aplikaci esenciálního oleje tak, aby byla prodloužena jeho účinnost a nedocházelo k jeho znehodnocení  
45 slunečním svitem a v otevřeném prostředí na povrch rostlin s dostatečnou reziduální účinností.

Na přiloženém výkresu je na Grafu 1 zobrazeno poškození listů obilovin houbou *Pyrenophora teres*  
v jednotlivých variantách ošetření.

Fungicidní prostředek podle vynálezu byl původci s úspěchem ověřen v praxi při testech  
50 přihlašovatelů, kterými jsou Česká zemědělská univerzita v Praze, CZ, a Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž, CZ.

Následující příklady provedení fungicidní prostředek podle vynálezu pouze dokládají, ale nijak  
55 neomezuji.

Příklady uskutečnění vynálezu

## 5   Příklad 1

Fungicidní prostředek podle vynálezu byl připraven následujícím způsobem:

10   Do 100ml kádinky bylo nalito 15 ml 10% esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného v řepkovém oleji.

Připipetovalo se 300 µl přípravku polyethylenglykol sorbitan monooleát (TWEEN 80) (Sigma Aldrich P1754).

15   Směs byla emulgována pomocí homogenizátoru DI 25 basic (IKA) při 20 000 rpm po dobu 3 minut.

Dále bylo připipetováno 20 ml biopolymeru z chitosanu a želatiny v jejich vzájemném poměru 3:10.

20   Směs byla emulgována v homogenizátoru při 20 000 rpm po dobu 3 minut.

Do vysoké 250ml kádinky bylo připraveno 114,7 ml 0,5% roztoku trypolyfosfátu sodného (TPP) (Sigma Aldrich T5633) o hodnotě pH 5,0.

25   Do roztoku TPP byl pomalu vlit obsah 100 ml kádinky.

Při liti roztoku TPP nutno emulgovat při 20 000 rpm a následně ještě další 3 minuty emulgovat stejným způsobem.

30   Účinnost nového fungicidního prostředku podle vynálezu byla ověřena v experimentu ve skleníkových podmínkách společně s dalšími vybranými fungicidními prostředky označenými A, B, G, D, přičemž prostředek A je předmětem tohoto vynálezu. Vždy 168 rostlin (28 kultivačních nádob po šesti rostlinách) jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůda Prestige (náchylná k *Pyrenophora teres*) v každé variantě ošetření byla ve fázi dvou listů ošetřena jednotlivými formulacemi, a to postřikem na list fungicidním prostředkem v koncentraci 10 % hmotn. koacervátu a cílové koncentraci 1 % hmotn.. Před aplikací byly rostliny uměle inokulovány směsí konidií a fragmentů mycelia *Pyrenophora teres* - 12 virulentních izolátů získaných v roce 2015 z ječmene na území České republiky. Tím bylo zabezpečeno, že napadení rostlin bude dostatečné pro vyhodnocení účinnosti jednotlivých variant ošetření. Součástí experimentu byla i varianta kontrolní bez ošetření a také varianta se standardním syntetickým fungicidem jako standardem.

45   Dosažené výsledky jsou znázorněny v příloženém grafu 1, kde je uvedeno procento poškození listů houbou *Pyrenophora teres* v jednotlivých variantách ošetření. Nejlepší účinnosti dosáhl standard. U variant s ošetřením jednotlivými fungicidními prostředky bylo dosaženo významného potlačení rozvoje napadení listů houbou *Pyrenophora teres*.

## Příklad 2

50   Účinnost nového fungicidního prostředku podle vynálezu byla ověřena v dalším experimentu v polních podmínkách experimentu společně s dalšími vybranými fungicidními prostředky označenými A, B, G, D, přičemž prostředek A je předmětem tohoto vynálezu. V polním experimentu byla vyseta odrůda jarního ječmene Malz náchylná k *Blumeria graminis*. Aplikace fungicidních prostředků byla provedena postřikem na list ve fázi objevení se praporcového listu.

55   Všechny čtyři prostředky byly aplikovány postřikovačem na list. Do experimentálního schématu

byla zařazena varianta kontrolní (voda) a také varianta se standardním fungicidem (Hutton 0,8 l.ha<sup>-1</sup>, Prothiokonazol 100 g/l, Spiroxamin 250 g/l, Tebukonazol 100 g/l). Všechny varianty byly založeny ve 4 opakováních s parcelami o rozměru 10 m<sup>2</sup> náhodně rozmístěnými. Hodnocení bylo provedeno ve fázi mléčné zralosti. Bylo hodnoceno vždy 40 listů v každé variantě v listových pater F-2 a F-3.

Dosažené výsledky jsou znázorněny v tabulce 1. Aplikací fungicidního prostředku podle vynálezu A bylo dosaženo významné redukce poškození listů patogenem *Blumeria graminis*, odrůda jarního ječmene Malz.

Tabulka 1

Varianta	List F-2	List F-3	průměr	účinnost
Kontrola	3,50	30,09	16,79	-
Hutton	0,00	4,11	2,05	87,76
A	0,12	23,01	11,56	31,14
B	0,53	26,78	13,65	18,69
G	0,37	27,70	14,03	16,43
D	0,22	26,13	13,17	21,55
průměr	0,79	22,97	11,88	-

Příklad 3

Účinnost nového fungicidního prostředku podle vynálezu byla ověřena v dalším experimentu v polních podmínkách experimentu společně s dalšími vybranými fungicidními prostředky označenými A, G, D, přičemž prostředek A je předmětem tohoto vynálezu. V polním experimentu byla vyseta pšenice ozimá odrůda Bohemia. Před provedením aplikace fungicidních prostředků v růstové fázi kvetení byla provedena i umělá inokulace rostlin makrokonidii virulentního kmene *F. culmorum*. Aplikace fungicidních prostředků byla provedena postřikem do klasů. Do experimentálního schématu byla zařazena varianta kontrolní (voda) s inokulací a varianta kontrolní bez inokulace. Dále varianta se standardním fungicidem (Prosaro 0,75 l.ha<sup>-1</sup>, Prothiokonazol 125 g/l, Tebukonazol 125 g/l). Všechny varianty byly založeny ve 4 opakováních s parcelkami náhodně rozmístěnými. Hodnocení bylo provedeno ve fázi mléčné voskové zralosti. Bylo hodnoceno vždy 80 klasů v každé variantě. Po sklizni bylo zmo odesláno ke stanovení obsahu mykotoxinu deoxynivalenol (DON) pomocí metody ELISA.

Dosažené výsledky jsou znázorněny v tabulce 2. Aplikací fungicidního prostředku podle vynálezu A bylo dosaženo významné snížení obsahu mykotoxinu.

Tabulka 2

Varianta	% napadení klasů	účinnost	DON µg.kg <sup>-1</sup>	účinnost
Kontrola inokulace ano	7,00	-	4861,2	-
Prosaro	0,00	100	508,5	89,53
A	3,00	57,14	1588,0	67,33
G	6,00	14,28	2458,0	49,43
D	6,00	14,28	2705,5	44,34
Kontrola inokulace ne	0,0	100*	52,5	98,92*
průměr	-	-	2028,95	-

\* hvězdičkou označená hodnota neudává účinnost aplikace, pouze vyjadřuje efekt neprovedení inokulace

Průmyslová využitelnost

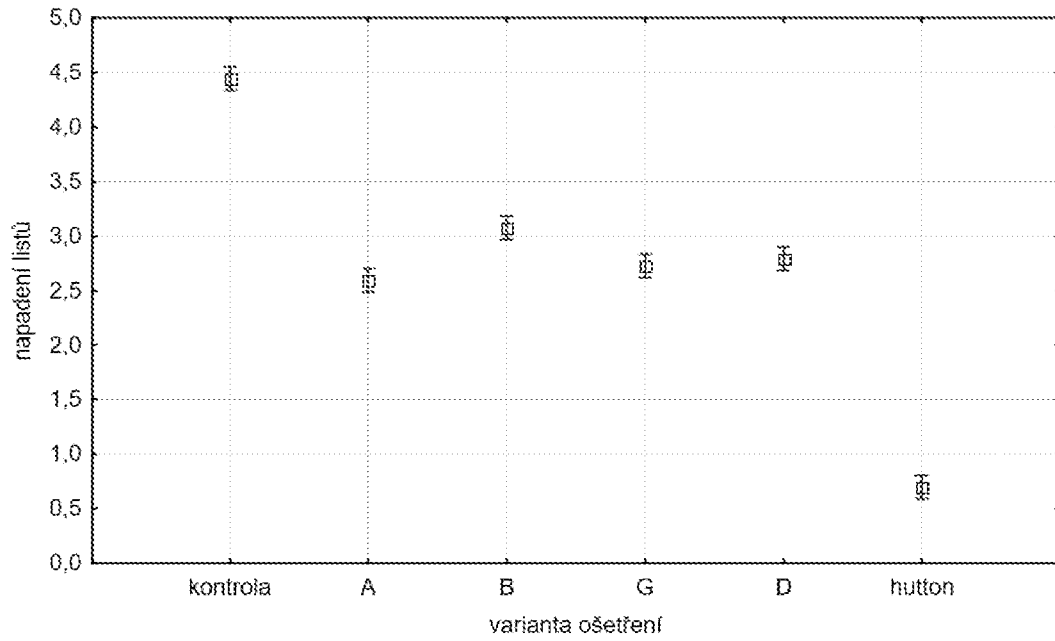
- 5 Nový stabilní fungicidní prostředek na ochranu rostlin proti houbovým patogenům na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* je charakterizován tím, že mikrokapičky esenciálního oleje jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan, dále se řešení týká i výroby těchto mikrokapsulí. Pro ochranu rostlin lze použít tuto suspenzi, a to pro obilniny v koncentraci 10 % hmotn. koacervátu a v následném ředění 1 %  
10 hmotn. esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* do postřikové jichy, a to v dávce 300 l/ha.

**PATENTOVÉ NÁROKY**

- 15 1. Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, **vyznačující se tím**, že obsahuje stabilní formu esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* v podobě mikrokapiček esenciálního oleje, které jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan v poměru 3:10, kdy ve 100 ml fungicidního prostředku je  
20 obsaženo 0,5 až 1,5 ml esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, 9,5 až 8,5 ml řepkového oleje na ředění esenciálního oleje, 0,2 ml polyethylenglykol sorbitanu monooleátu, 13,3 ml biopolymeru tvořícího obal mikrokapiček a 76,5 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného.
2. Způsob výroby fungicidního prostředku podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že do nádoby  
25 se nalije 15 ml 10% hmotn. esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného v řepkovém oleji, k němuž se přidává 300 µl přípravku polyethylenglykol sorbitanu monooleátu a tato směs se emulguje pomocí homogenizátoru při 18 000 až 22 000 rpm po dobu 3 minut, dále se přidává 20 ml biopolymeru želatiny a chitosanu a směs se emulguje při 20 000 rpm po dobu 3 minut, pak se  
30 připravená emulze pomalu vlévá do jiné nádoby obsahující 114,7 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného o hodnotě pH 5,0 a to při 18 000 až 22 000 rpm a následně promíchává ještě další 3 minuty za vzniku stabilního fungicidního prostředku.
3. Použití fungicidního prostředku na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* jako ochrana rostlin proti houbovým patogenům *Pyrenophora teres*, *Blumeria graminis*  
35 a *Fusarium culmorum* pro potřeby ekologických a integrovaných systémů pěstování obilnin, přičemž na 1 ha rostlin se použije 200 až 400 l fungicidního prostředku.

1 výkres

"Prom1"; Průměry MNČ  
 Současný efekt:  $F(5, 826)=472,14, p=0,0000$   
 Dekompozice efektivní hypotézy  
 Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti



Graf 1