

TN02000044/1 – V6

**EKOLOGICKÝ POMOCNÝ
ROSTLINNÝ PŘÍPRAVEK
S OBSAHEM ŽIVÝCH
MIKROORGANISMŮ
(FUNKČNÍ VZOREK)**

T A
Č R

Projekt BIOCIRKL (TN02000044) je řešen s finanční podporou TA ČR.

Ekologický pomocný rostlinný přípravek s obsahem živých mikroorganismů

Autorský kolektiv: Hašek Tomáš¹, Patáková Petra¹, Branská Barbora¹, Bočková Tereza², Lovecká Petra², Jandejsek Zdeněk³, Melzoch Karel¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

²Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

³Rabbit a.s., Trhový Štěpánov

Datum dokončení přípravy funkčního vzorku: 29. 5. 2026

Místo zpracování a uložení: Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6

Popis funkčního vzorku

Funkční vzorek byl vyvinut jako možná náhrada chemických fungicidů s příznivým nebo neutrálním dopadem na životní prostředí, kdy zároveň pro jeho přípravu jsou využívány vedlejší zemědělské produkty z živočišné výroby (peří). Funkční vzorek je založen na kombinovaném využití suroviny, kuřecí peří, a tří izolátů endofytních bakterií s antifungální aktivitou proti patogenní houbě *Verticillium dahliae*. Peří je hydrolyzováno alkalickou hydrolýzou a poté využito jako kultivační substrát pro endofytní bakterie. Celkový preparát je koncipován jako 3 složkový: bakteriální zmrazené kapalně inokulum trojího typu (**1a, b, c**), péřový hydrolyzát (**2a, b, c**), 1 M kyselina fosforečná (**3a, b, c**). Reálnou podobu funkčního vzorku ukazuje Obr. 1. Funkční vzorek je uložen v místnosti 119, 1.patro, budova A VŠCHT Praha na Ústavu biotechnologie.



Obr. 1 Funkční vzorek skládající se ze tří složek

1a, b, c - rozmražená suspenzní tříložková kultura; 2a, b, c - péřový hydrolyzát 3a, b, c - kyselina fosforečná na úpravu pH

Složení bakteriálního konsorcia a příprava směsné inokulační kultury (1)

- a) *Pantoea agglomerans* DBM 3797 - izolát z čerstvých listů chmele, uložen na Ústavu biotechnologie VŠCHT Praha
- b) *Kosakonia cowanii* KC3– izolát z čerstvých listů chmele, uložen na Ústavu biotechnologie VŠCHT Praha
- c) *Pseudomonas savastanoi* 8B – izolát z listů fíkovníku, uložen na Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha

Výběr kmenů byl proveden na základě schopnosti růstu v péřovém hydrolyzátu a testování antifungálních vlastností. Kmeny jsou jednotlivě dlouhodobě uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80 °C v 30% roztoku glycerolu.

Pro přípravu inokula jsou uvedené bakterie, po zaočkování z kryokonzervy (1ml/100 ml hydrolyzátu), kultivovány při 26 °C na třepačce při otáčkách 150 RPM po dobu 24 h. Všechna inokula jsou skladována při -20 °C (skladování po dobu max. 6 měsíců) nebo -80 °C (dlouhodobé uchování) v 30% roztoku glycerolu.

Příprava hydrolyzátu (2):

20 g kuřecího peří

1 L vody

6 g hydroxidu draselného

Kuřecí peří o hmotnosti 20 g je smícháno v 2 l Erlenmeyerově baňce s 1 L vody a 6 g hydroxidu. Baňka je následně umístěna na temperovanou třepačku s následujícím nastavením: 80 °C, 150 RPM, 24 hodin. Vlivem hydroxidu dochází k téměř kompletní hydrolyze přítomného peří s malým zbytkovým pevným podílem. Pro kultivaci mikroorganismů se využije veškerý hydrolyzát, tj. kapalný i pevný podíl. Díky výslednému pH cca 11-12 je riziko kontaminace hydrolyzátu minimální, a ten může tak být skladován bez dalších úprav v lednici při teplotě 6-8 °C, není-li ihned využit. Před inokulací je třeba upravit pH na hodnotu 6,5-7 přidavkem zředěné kyseliny fosforečné.

Příprava 1 M kyseliny fosforečné na úpravu pH hydrolyzátu (3):

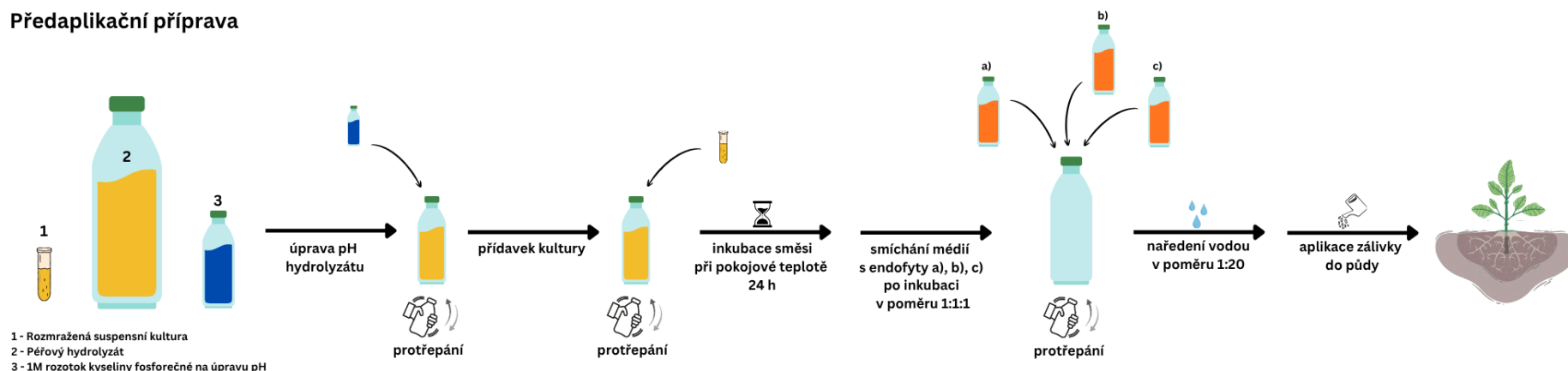
85 % kyselina fosforečná

Destilovaná voda

Kyselina fosforečná byla přidána do volumetrické baňky s destilovanou vodou v patřičném poměru pro získání výsledné 1M koncentrace. Takto připravená kyselina se poté skladuje v uzavíratelných zkumavkách a použije se k úpravě pH péřového hydrolyzátu, a to v poměru 5 ml 1 M kyseliny na 100 ml hydrolyzátu. Přídavek kyseliny vede ke změně hodnoty pH z 12 na 7.

Schéma předaplikační přípravy preparátu je uvedeno na Obr. 2, přičemž preparát je možné použít jako zálivku do půdy pro rostliny napadené houbou *Verticillium dahliae* nebo také využít pro předpěstební ošetření půdy, v případě výskytu tzv. verticiliového vadnutí v předchozí sezóně (houba tvoří sklerocia, které v půdě přezimují a způsobují riziko dlouhodobých problémů v dané lokalitě).

Předaplikační příprava



Obr. 2 Schéma předaplikační přípravy funkčního vzorku

Funkční vzorek skládající se ze 3 složek: 1 - rozmražená suspensní kultura (a, b, c), 2 - pěťový hydrolyzát a 3 - 1M roztok kyseliny fosforečné. Prvním krokem je třeba upravit pH pěťového hydrolyzátu (2) přidávkem 1M roztoku kyseliny fosforečné z lahvičky (3) do nádoby (2). Po protřepání je možné do připraveného hydrolyzátu s optimálním pH zaočkovat přelitím lahvičku se suspensní kulturou (1). Po opětovném protřepání se nechá směs inkubovat po dobu 24 hodin při 26 °C (postačí i pokojová teplota). Popsaný postup se aplikuje celkem 3x pro 3 různé endofytní kultury. Jejich nezávislá oddělená kultivace zaručuje dobrý nárůst všech kultur a tím zesílení fungicidního účinku ve výsledném preparátu. Následuje slití jednotlivých narostlých kultur do jedné lahve a po jejich protřepání naředění vodou v poměru 1:20 pro získání výsledné zálivky k okamžitému použití na aplikaci do půdy.

Doklad o testování funkčního vzorku (ověření vlastností)

Během přípravy funkčního vzorku a také po jeho dokončení byly prováděny testy prokazující jeho vlastnosti. Nejprve se jednalo o ověření, že všechny vybrané endofytní bakterie mají schopnost růstu v péřovém hydrolyzátu namísto standardního LB média **a)**. Dále se jednalo o schopnost potlačovat růst houby *Verticillium dahliae* v *in vitro* testu na Petriho miskách **b)** a také při kultivačním testu, kdy byl sporami *V. dahliae* inokulován substrát pro pěstování římského salátu **c)**.

a) Stanovení koncentrace kolonie tvořících jednotek (CFU) bakterií po kultivaci v péřovém hydrolyzátu a v LB médiu

Stanovení koncentrace kolonie tvořících jednotek jednotlivých druhů po kultivaci v LB médiu a v péřovém hydrolyzátu bylo provedeno zaočkováním narostlých kultur v množství 0,1 ml na povrch Petriho misek s pevným agarovým LB médiem. Pro získání počitatelného množství kolonií byla využita řada desítkového ředění. Misky byly inkubovány 24 h v termostatu při teplotě 26 °C.

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{počet kolonií} \times \text{ředicí faktor}}{\text{objem naneseného média}}$$

Tab. 1 Stanovení množství kolonie tvořících jednotek bakterií kultivovaných v LB média a v péřovém hydrolyzátu

LB medium	CFU/ml
<i>Pantoea agglomerans</i>	$5,7 \times 10^8$
<i>Kosakonia cowanii</i>	$7,2 \times 10^9$
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	$3,5 \times 10^7$
Péřový hydrolyzát	CFU/ml
<i>Pantoea agglomerans</i>	$2,4 \times 10^{11}$
<i>Kosakonia cowanii</i>	$6,6 \times 10^{11}$
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	$5,3 \times 10^{10}$

Výsledky v Tab. 1 jednoznačně potvrzují, že péřový hydrolyzát po úpravě pH lze využít místo drahého syntetického LB média s tím, že bakterie v něm rostou lépe.

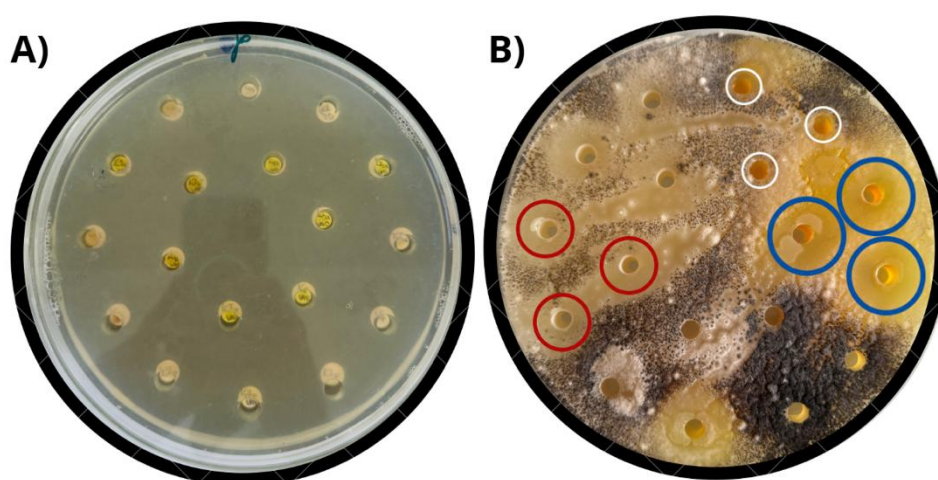
b) Testování antifungální aktivity na agarových plotnách:

Pevné agarové LB medium v Petriho miskách o průměru 20 cm bylo použito na test antifungální aktivity zvolených bakterií proti patogenní houbě *Verticillium dahliae*. Povrch agarových ploten byl zaočkován inokulem houby o objemu 1 ml se stanoveným OD 0,1. Po zaschnutí houbového inokula byly do média sterilním korkovrtem vytvořeny jamky, do

kterých bylo nadávkováno 0,3 ml péřového hydrolyzátu s narostlou bakteriální kulturou dle předcházejícího popisu přípravy funkčního vzorku. Poté se nechaly misky kultivovat v termostatu při teplotě 26 °C po dobu 5 dnů a následně byly vyhodnoceny inhibiční zóny okolo jamek. Každá bakteriální kultura byla testována v triplicátu.

Bylo pozorováno potlačení růstu patogenní houby *Verticillium dahliae*, kdy byla antifungální aktivita detekována u všech testovaných kultur, a to v různé intenzitě. Seřazeno od nejvyšší po nejnižší aktivitu:

Kosakonia cowanii > *Pseudomonas savastanoi* > *Pantoea agglomerans*, jak je viditelné i na Obr. 3.



Obr. 1 Test antifungální aktivity bakteriálních kultur vůči patogenní houbě *Verticillium dahliae*. A) Petriho miska před kultivací. B) Petriho miska po 5-denní kultivaci v termostatu při 26 °C. Bílé kružnice ohraničují inhibiční zónu okolo *Pantoea agglomerans*, modré kružnice okolo *Kosakonia cowanii* a červené kružnice okolo *Pseudomonas savastanoi*.

c) Testování účinnosti kompletního preparátu, připraveného podle schematu na Obr. 2 na sazenicích římského salátu

Sazenice římského salátu *Lactuca sativa* var. *Longifolia* pěstované 3 týdny byly zakoupeny v Zahradnictví Chládek a byly bez dalších úprav použity pro testování. Pro testování za při nastavených podmínkách bylo využito vždy 6 sazenic, které byly odděleny od ostatních v jednom pěstebním stanu Secret Jardin Dark Propagator 60×40×60 cm (Growmarket, Czechia) se simulovaným denním světlem po dobu 12 hodin (osvětlení GENT G-LED 26 W, 6500 K umístěné uprostřed stropu pěstebního stanu). Celkem byly využity 4 stany s 24 sazenicemi. Sazenice rostly po dobu jednoho týdne při teplotě 26–28 °C a vlhkosti pohybující se okolo 80 %. Římský salát byl vybrán jako testovací systém na základě předchozí zkušenosti (Hašek et al. 2025) a také proto, že podléhá tzv. verticiliovému vadnutí, které je způsobeno kontaminací půdy spory *V. dahliae*.

Příprava a aplikace inokula patogenní houby *Verticillium dahliae*:

Narostlá kultura patogenní houby byla dispergována ve sterilní destilované vodě, nebyl použit fyziologický roztok, aby nedošlo k zasolení půdy sazenic. Výsledná koncentrace se poté upravila na OD 0,5 a objem 5 mL byl aplikován k sazenicím salátu ve stanech, pracovně označených jako **Negativní kontrola** (sazenice byly zalévány jen vodou) a **Ošetření** (sazenice byly ošetřeny zálivkou, připravenou podle Obr. 2).

Příprava zálivky pro sazenice římského salátu

Připravená média založená na pěřovém hydrolyzátu s narostlou biomasou (po 24 h kultivace) byla smíchána v poměru 1:1:1 (*Pantoea agglomerans* : *Kosakonia cowanii* : *Pseudomonas savastanoi*) a vzniklá suspenze byla naředěna destilovanou vodou v poměru 1:20 (směs:voda).

Aplikace zálivky k sazenicím římského salátu

Zálivka směsné kultury (Z) byla jednorázově aplikována do půdy, viz Obr. 2, v objemu 10 mL/sazenice v případě testu, označeného jako **Positivní kontrola** (do půdy pro pěstování nebyla vpravena kultura *V. dahliae*, ale sazenice byly zalévány zálivkou připravenou podle Obr. 2, aby se vyloučil případný negativní vliv funkčního vzorku na zdravé rostliny) a **Ošetření**. Na ostatní testované sazenice – **Kontrola** (sazenice rostly v půdě bez aplikace houbové kultury a nebyly zalaty zálivkou připravenou podle Obr. 2) a jako **Negativní kontrola** byla aplikována destilovaná voda (V) téhož objemu. Detailnější přehled rozdílů mezi pěstebními stany je uveden v tabulce 2. Všechny skupiny sazenic skupina byly pěstovány samostatně po dobu jednoho týdne.

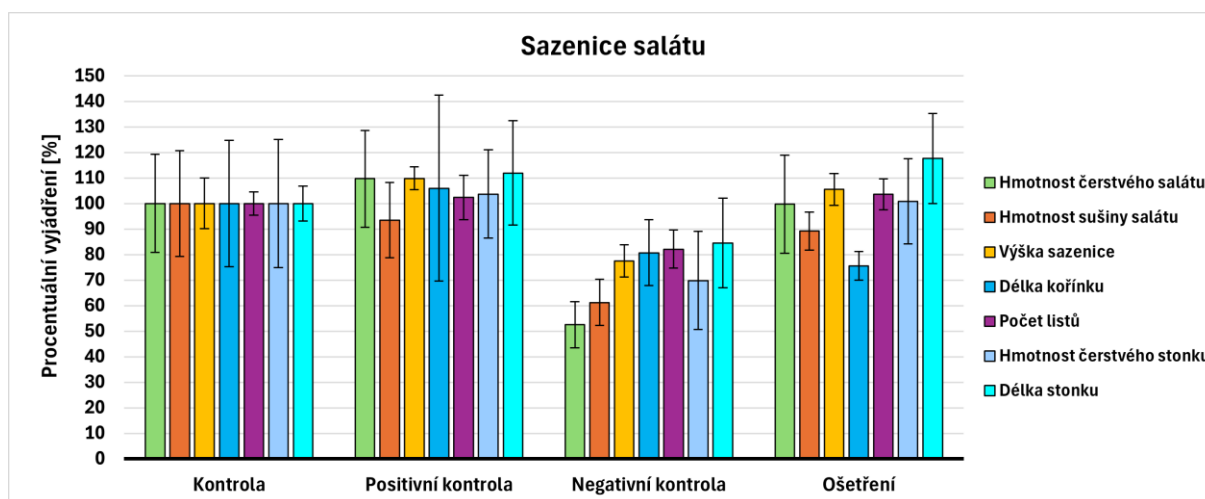
Tab. 2 Plán aplikace houbového patogenu *Verticillium dahliae* DSM 63083 a antifungálního přípravku tvořeného směsí bakteriálních kultur narostlých v pěřovém hydrolyzátu do půdy využitě pro pěstování sazenic římského salátu. Po 168 hodinách byl test ukončen.

Doba aplikace	Typ média k aplikaci	KONTROLA	POSITIVNÍ KONTROLA	NEGATIVNÍ KONTROLA	OŠETŘENÍ
		[ml/sazenice]	[ml/sazenice]	[ml/sazenice]	[ml/sazenice]
0 hod	Očkovací dávka <i>Verticillium dahliae</i> s OD 0,5	X	X	5	5
24 hod	Zálivka se směsnou kulturou (Z), nebo Voda (V)	(V) 10	(Z) 10	(V) 10	(Z) 10
48 hod	Voda	10	10	10	10
96 hod	Voda	10	10	10	10

Vyhodnocení efektu funkčního vzorku na sazenice salátu:

Jednotlivé sazenice byly vizuálně zkontrolovány a porovnány. Následně byly sazenice vyjmuty ze sadbovačů, substrát kolem jejich kořenového systému byl promytím ve vodě odejmut a po osušení kořenů došlo ke zvážení celé sazenice. Další parametry jako výška sazenice, délka kořínků, délka a hmotnost stonku, počet listů byly také sledovány. Po proměření byly jednotlivé sazenice usušeny do konstantní hmotnosti a poté byla jejich sušina zvážena na analytických vahách. Data byla zpracována pomocí softwaru Microsoft Excel, kdy byly vypočteny průměrné hodnoty naměřených hodnot a jejich směrodatné odchylky.

Výsledky testu udává Obr. 4. Bylo pozorováno, že funkční vzorek dosahoval antifungálních účinků, kdy napadení patogenní houbou bylo sníženo oproti negativní kontrole. Po ošetření sazenic funkčním vzorkem bylo dosaženo srovnatelných hodnot vyhodnocovaných znaků jako u kontrolního měření vyjma délky kořínků. Nejviditelnější rozdíl je u negativní kontroly, kde přítomnost patogenní houby *Verticillium dahliae* vedla k nižším výnosům, kdy některé listy byly i viditelně napadené na povrchu a seschlé, jak je vidět i na Obr. 5D. Sazenice kontroly, pozitivní kontroly, a ošetření byly po celou dobu testu zelené s minimálním výskytem nažloutlých listů, Obr. 5B, C, E v porovnání s bezchybnými sazenicemi při jejich koupi, Obr. 5A.



Obr. 4 Porovnání jednotlivých sledovaných parametrů pěstovaných sazenic salátu dle jednotlivých podmínek (Kontrola, Positivní kontrola, Negativní kontrola a Ošetření). Sledované parametry hmotnost čerstvého salátu, hmotnost sušiny salátu, výška sazenice, délka kořínku, počet listů, hmotnost čerstvého stonku, délka stonku.



Obr. 5A Stav sazenic po koupi v Zahradnictví Chládek. Zelené, bez viditelného zasychání, případně hniloby.



Obr. 5B *Kontrola*. Sazenice salátu po týdnu pěstování. Zavlažovány pouze destilovanou vodou dle nastavení uvedeného v Tab. 2. Výsledky jednotlivých parametrů uvedeny v Obr. 4.



Obr. 5C *Positivní kontrola*. Sazenice salátu po týdnu pěstování. Zavlažovány destilovanou vodou dle nastavení uvedeného v Tab. 2. ***Druhý den aplikován funkční vzorek*** o objemu 10 mL/sazenice. Výsledky jednotlivých parametrů uvedeny v Obr. 4.



Obr. 5D Negativní kontrola. Sazenice salátu po týdnu pěstování. Zavlažovány pouze destilovanou vodou dle nastavení uvedeného v Tab. 2. **První den aplikováno inokulum patogenní houby *Verticillium dahliae* o objemu 5 mL/sazenice.** Červené elipsy znázorňují zavadnutí způsobené houbou. Výsledky jednotlivých parametrů uvedeny v Obr. 4.



Obr. 5E Ošetření. Sazenice salátu po týdnu pěstování. Zavlažovány pouze destilovanou vodou dle nastavení uvedeného v Tab. 2. **První den aplikováno inokulum patogenní houby *Verticillium dahliae* o objemu 5 mL/sazenice. Druhý den aplikován funkční vzorek o objemu 10 mL/sazenice.** Výsledky jednotlivých parametrů uvedeny v Obr. 4.

Shrnutí

Funkční vzorek, skládající se ze tří základních složek – péřový hydrolyzát, kyselina fosforečná a bakteriální kultura, vyobrazen na Obr. 1, valorizuje vedlejší produkt živočišné výroby, kuřecí peří, neboť se po hydrolýze a úpravě pH využívá jako kultivační médium pro endofytní bakterie namísto nákladného LB média. Trio endofytních bakterií bylo zvoleno nejen pro svou schopnost růstu v hydrolyzátu z peří, ale také pro ochranu proti houbovému patogenu *Verticillium dahliae*. Účinek funkčního vzorku byl ověřen při laboratorní kultivaci římského salátu, kdy substrát pro jeho pěstování byl záměrně nakažen houbou *V. dahliae*. Zároveň byl prokázán neutrální vliv funkčního vzorku při pěstování nenakažených sazenic.

Jednotlivé složky vzorku si nekladou zvláštní nároky na uchování, zapotřebí je běžný mrazák (teplota -18 °C) pro bakteriální kultury a lednice (teplota 6-8 °C) pro uchování hydrolyzátu. Předaplikační příprava je snadná a nevyžaduje velké úsilí ani speciální podmínky (smíchání složek, stání při pokojové teplotě po dobu 24 h a naředění vodou). Aplikace je o to snazší, neboť se jedná o zálivku do půdy. Funkční vzorek, vzhledem ke svému charakteru (péřový hydrolyzát neutralizovaný kyselinou fosforečnou) slouží rostlinám nejen jako fungicid, ale i pro doplnění zdrojů dusíku, fosforu a draslíku. Vzhledem k tomu, že byl ověřen i jeho neutrální vliv na zdravé rostliny, je možné uvažovat o jeho preventivní aplikaci do půdy, kde se v předchozí pěstební sezóně vyskytovala u rostlin nákaza projevující se jako verticiliové

vadnutí. Je totiž známo, že tato patogenní houba dlouhodobě přežívá v půdě v podobě sklerocií a její eradikace není snadná.

Reference:

Hasek, T., Kastanek, F., Smirnova, T.A. *et al.* Ammonia release from hydrolysed animal and food waste by the hop endophyte, *Pantoea agglomerans*. *World J Microbiol Biotechnol* **41**, 494 (2025). <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04720-0>