

TN02000044/3 – V5

**KOMBINOVANÝ POMOCNÝ
ROSTLINNÝ PŘÍPRAVEK K
APLIKACI DO PŮDY NEBO NA
LISTY**

(FUNKČNÍ VZOREK)

Kombinovaný pomocný rostlinný přípravek k aplikaci do půdy nebo na listy

Autorský kolektiv: Hašek Tomáš¹, Patakova Petra¹, Branska Barbora¹, Lovecka 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: 7. 11. 2025

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

Popis funkčního vzorku

Podstatou celého funkčního vzorku je kombinované využití odpadního materiálu z živočišné výroby (kuřecí peří), které je po hydrolýze využito jako kultivační substrát pro směs tří endofytních bakterií s různými vlastnostmi prospěšnými pro rostliny. Celkový preparát je koncipován jako 3 složkový (péřový hydrolyzát **(1)**, bakteriální inokulum (sušené imobilizované bakterie na perlitových kuličkách **(2A)** nebo zmrazené kapalně inokulum **(2B)**, 1 M kyselina fosforečná **(3)**). Reálnou podobu funkčního vzorku ukazuje Obr. 1.

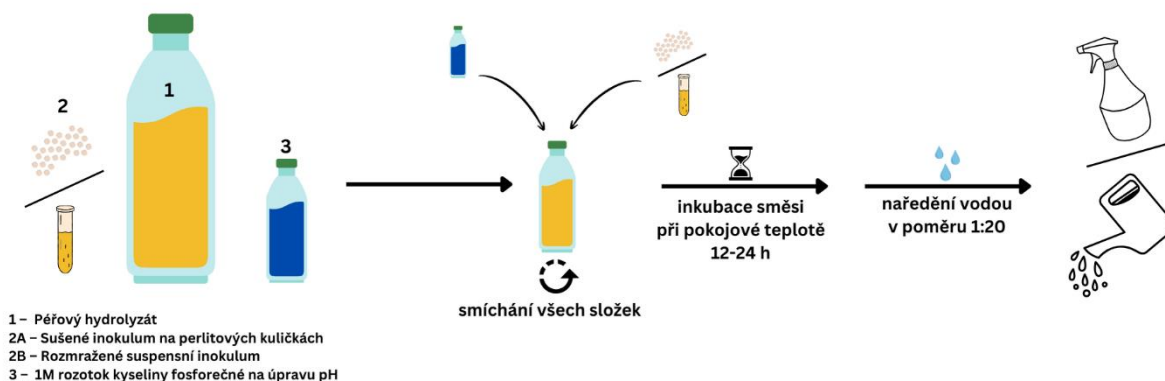


Obr. 1 Funkční vzorek skládající se ze tří složek

1 -péřový hydrolyzát; 2a - suché perlitové kuličky se směsnou kulturou; 2b - rozmražená suspenzní kultura; 3 - kyselina fosforečná na úpravu pH

Schéma předaplikační přípravy preparátu je uvedeno na Obr.2, přičemž preparát je možné použít jak pro běžnou závlivku do půdy, tak na listy. Postup přípravy jednotlivých složek funkčního vzorku a testování jejich vlastností je uveden v dalším textu.

Předaplikační příprava



Obr. 2 Schéma předaplikační přípravy funkčního vzorku

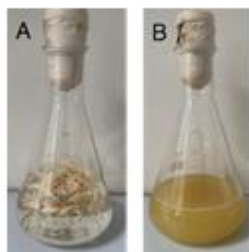
Příprava hydrolyzátu (1):

20 gramů drůbežího peří

1 L vody

6 gramů hydroxidu draselného

Drůbeží peří o hmotnosti 20 gramů 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 hydrolýze 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.



Obr. 2 Příprava hydrolyzátu

A-Příprava pěťového hydrolyzátu: voda, peří, hydroxid; B – Hotový hydrolyzát

Vybrané endofytní bakterie (2)

Použité kmeny:

Pantoea agglomerans DBM 3797

Pseudomonas brassicacearum 50ŘKČ20

Paenibacillus amylolyticus 50TCL4

Výběr kmenů byl proveden na základě schopnosti růstu v péroovém hydrolyzátu a dále testování vlastností prospěšných pro rostliny. Kmeny jsou dlouhodobě uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80 °C v 30% roztoku glycerolu.

Příprava sušeného inokula bakterií na perlitových nosičích (2A):

Uvedené bakterie byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml s 50 ml LB média, po zaočkování z kryokonzervy příslušného kmene v poměru 1 % v/v. Inokulační kultury tak byly připraveny po 24 hodinách kultivace při 26 °C na třepačce při otáčkách 150 RPM. Následující den byly další čerstvé Erlenmeyerovy baňky s 50 ml LB media zaočkovány 1 % v/v inokula, tedy 0,5 ml suspenze jednotlivých kultur nebo 0,5 ml směsná kultury (ve směsné kultuře je poměr zastoupení kmenů 1:1:1). Směs kmenů byla předem připravena v mikrozkuhavce a následně protřepaná před jejím přidáním do média. Ve všech baňkách byly přítomné sterilní perlitové kuličky pro adsorpci bakteriálních buněk na povrch a do pórů. Navážka perlitových kuliček činila 1 g/100 ml média. Kultivace s perlitovými kuličkami probíhala na temperované třepačce s následujícím nastavením: 26 °C, 150 RPM, 24 hodin. Po kultivaci byly perlitové kuličky asepticky odebrány do Petriho misek a kuličky v miskách se nechaly sušit v sušárně při teplotě 40 °C po dobu 24 hodin. Suché perlitové kuličky s bakteriálními kulturami byly skladovány při pokojové teplotě, viz Obr. 3.



Obr. 3 Snímek zobrazující perlitové nosiče s imobilizovanými bakteriálními buňkami.

(Směsná kultura, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas brassicacearum* a *Paenibacillus amylolyticus*)

Příprava zmraženého inokula (2B):

Bakteriální kultury narostlé v LB médiu (26 °C, 24-48 h) byly bez odstředění společně s médiem po kultivaci zamrazeny ve sterilních zkumavkách v porcích o 1 ml a skladovány při teplotě -18 °C.

Při porovnání inokulace sušenou kulturou na perlitových nosičích a rozmraženými kulturami bylo potvrzeno, že oba typy inokula lze pro přípravu funkčního vzorku využít.

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

85 % kyselina fosforečná

Destilovaná voda

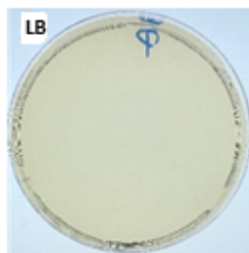
Kyselina fosforečná byla přidána do volumetrické baňky s destilovanou vodou v patřičném poměru pro získání výsledné 1M koncentrace. Takto připravená kyselina byla poté skladována v uzavíratelných zkumavkách a použita k úpravě pH péřového hydrolyzátu, a to v poměru 5 ml 1 M kyseliny na 100 ml hydrolyzátu.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

Doklad o testování funkčního vzorku (ověření vlastností)

Během přípravy funkčního vzorku a také po jeho dokončení byly prováděny testy prokazující jeho funkční vlastnosti. Nejprve se jednalo o ověření, že péřový hydrolyzát je dlouhodobě mikrobiálně stabilní a nepodléhá kažení, viz **a)**. Dále bylo prokázáno, že vybrané endofytní bakterie mají schopnost tvořit nebo uvolňovat z prostředí látky podporující růst rostlin, viz **b)**. Poté bylo prokázáno, že bakteriální inokulum lze připravit sušením po imobilizaci na perlitových nosičích, viz **c)** a že takto připravené inokulum lze použít pro přípravu funkčního vzorku, viz **d)**. Na závěr pak bylo ověřeno, že připravená inokula, jak sušená, tak zmražená mají schopnost růstu v péřovém hydrolyzátu po úpravě pH, viz **e)**.

a) Mikrobiologická čistota hydrolyzátu při skladování

Testy, při kterých byl vzorek hydrolyzátu o objemu 1 ml zaočkován na povrch LB agaru (o složení v g/l: pepton 10, kvasničný extrakt 5, NaCl 10, agar 20) prokázaly, že ani dlouhodobé skladování (2 měsíce) nevede ke kontaminaci produktu, protože nebyly po kultivaci v termostatu při 26 °C po dobu 48 h zaznamenán nárůst žádných kolonií viz Obr. 4.



Obr. 4 Kontrola mikrobiologické čistoty hydrolyzátu po skladování

Petriho miska s LB agarem po 24 h kultivaci při 26 °C.

b) Testování endofytních bakterií na schopnost produkce látek prospěšných pro rostliny

Testována byla schopnost uvolňování volných amonných iontů do média, přičemž měření bylo prováděno pomocí iontově selektivní elektrody. Při využití bakterie *P. amylolyticus* bylo dosaženo až koncentrace amonných iontů 1,6 g/l, s využitím *P. brassicacearum* 0,8 g/l a u bakterie *P. agglomerans* se jednalo o 0,7 g/l. Dále byla pomocí Salkowského činidla prokázána schopnost tvorby derivátů kyseliny indolactové z tryptofanu a sideroforů u všech uvedených bakterií, solubilizace

anorganického (*P.brassicaceaurum*) a organického (*P. agglomerans*) fosforu a antifungální účinky zabraňující růstu houbového patogenu *Verticillium dahliae* (*P. agglomerans*). Podobnosti provedení jednotlivých testů jsou uvedeny v publikacích Patakova a kol. 2024 a Hašek a kol. 2025.

c) Stanovení množství kolonie tvořících jednotek (CFU) bakterií skladovaných v sušeném stavu na perlitových nosičích

Množství imobilizovaných bakterií na perlitových nosičích bylo stanoveno pomocí Track-Dilution testu na pevném agarovém LB mediu. Perlitové nosiče o váze 1 g byly asepticky převedeny z média do falkon o objemu 50 ml s 20 ml fyziologického roztoku. Tyto nosiče byly třikrát promyty fyziologickým roztokem a poté byly třepány po dobu 3 minut ve 20 ml nového fyziologického roztoku pro uvolnění imobilizovaných bakteriálních buněk do média. Takto připravená suspenze buněk se poté podrobila desítkovému ředění a jednotlivé vzorky byly aplikovány na povrch pevného agarového LB media v Petriho miskách pomocí Track-Dilution testu, kdy se na startovní linii aplikovalo 10 µL média po kultivaci, a to v následujícím pořadí: neředěný vzorek, 10x, 100x, 1000x až 10 000 000x ředěný vzorek. Misky se poté naklonily, aby se vytvořily čárky/pruhy a takto připravené misky se nechaly v termostatu při teplotě 26 °C po dobu 24 hodin inkubovat. Následující den proběhlo stanovení počtu kolonie tvořících jednotek CFU (Colony Forming Unit) na ml suspenze, které bylo následně přepočteno na gram perlitových nosičů. Výpočet CFU/g udávají vzorce 1 a 2, výsledky testu uvádí Tabulka 1.

$$1) \frac{CFU}{mL} = \frac{\text{počet kolonií} \times \text{ředicí faktor}}{\text{objem naneseného média}}$$

$$2) \frac{CFU}{g} = \frac{\frac{CFU}{mL} \times \text{objem média}}{\text{hmotnost vzorku}}$$

Tab. 1 Stanovení CFU bakterií imobilizovaných na perlitových nosičích sloužících k inokulaci péřového hydrolyzátu.

Perlitové nosiče promývány fyziologickým roztokem a poté v něm i třepány. Jednotlivé vzorky naředěny desítkovým ředěním a stanovení proběhlo Track-Dilution testem na Petriho miskách.

Perlitové kuličky s kulturou z LB média	CFU/g
<i>Pseudomonas brassicaceaurum</i> 50ŘKČ20	1,59×10 ⁶
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 50TCL4	4,79×10 ⁷
<i>Pantoea agglomerans</i> DBM 3797	2,80×10 ⁸
Směs výše uvedených 1:1:1	1,99×10 ⁹

d) Porovnání inokulace suchou kulturou na perlitových nosičích (2A) a rozmraženými kulturami (2B)

Pro porovnání inokulace suchými perlitovými kuličkami s imobilizovanými kulturami a suspenzními rozmraženými kulturami byla nejprve provedena kultivace v LB médiu. Stanovení množství CFU jednotlivých druhů i směsné kultury bylo provedeno s využitím Petriho misek s pevným agarovým LB médiem, na kterých byl proveden Track-Dilution test, kdy se na startovní linii aplikovalo 10 μ L LB média po kultivaci, kdy očkování bylo provedeno perlitovými kuličkami se sušenou kulturou nebo rozmraženou kulturou, a to v následujícím pořadí: neředěný vzorek, 100x, 10000x a 1000000x ředěný vzorek. Zbýlý postup stejný jako výše popsany u stanovení množství kolonií tvořících jednotek v perlitových nosičích. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. 2.

Tab. 2 Stanovení množství kolonie tvořících jednotek bakterií z LB média po kultivaci zaočkované perlitovými kuličkami nebo rozmraženou kulturou.

Vyhodnocení pomocí Track-Dilution testu popsaného výše.

LB medium zaočkováno perlitovými kuličkami s kulturou	CFU/ml
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 50ŘKČ20	ND
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 50TCL4	ND
<i>Pantoea agglomerans</i> DBM 3797	3.00×10^6
Směs výše uvedených 1:1:1	4.00×10^6
 LB médium zaočkováno z rozmražené kultury	 CFU/ml
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 50ŘKČ20	$>10^6$
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 50TCL4	$>10^4$
<i>Pantoea agglomerans</i> DBM 3797	1.30×10^9
Směs výše uvedených 1:1:1	3.00×10^9

e) Ověření schopnosti růstu bakterií v péřových hydrolyzátech po inokulaci sušenou kulturou na perlitových kuličkách nebo rozmraženým inokulem

Kultivace probíhala v 100 ml Erlenmeyerových baňkách s 50 ml hydrolyzátu z peří upraveného na pH 7 pomocí 1 M kyseliny fosforečné. Do jednotlivých baňek byly přidány perlitové kuličky s daným kmenem či směsnou kulturou, viz Obr. 5, nebo bylo přidáno rozmražené a homogenizované médium z předchozí kultivace, které bylo přidáno v poměru 1 % v/v. Jako kontrola bylo místo péřového hydrolyzátu použito LB médium. Kultivace probíhala na temperované třepačce s následujícím nastavením: 26 °C, 150 RPM, 24 hodin.



Obr. 5 Názorná ukázka připravených médií ke kultivaci zaočkovaných perlitovými nosiči s imobilizovanými bakteriemi

Po skončení kultivace bylo provedeno porovnání nárůstu bakterií v péřovém hydrolyzátu a v LB médiu při využití různých způsobů očkování (perlitové kuličky se sušenou kulturou nebo očkování ze zmražené kultury uchovávané při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, přičemž výsledky ukazuje Tabulka 3.

Tab. 3 Stanovení množství kolonie tvořících jednotek bakterií z péřového hydrolyzátu po kultivaci zaočkovaném perlitovými kuličkami nebo rozmraženou kulturou. Vyhodnocení pomocí Track-Dilution testu popsaneého výše.

Péřový hydrolyzát zaočkován perlitovými kuličkami s kulturou	CFU/ml
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 50ŘKČ20	$8,00 \times 10^4$
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 50TCL4	$2,00 \times 10^4$
<i>Pantoea agglomerans</i> DBM 3797	$7,50 \times 10^7$
Směs výše uvedených 1:1:1	$1,40 \times 10^8$
Péřový hydrolyzát zaočkován z rozmražené kultury	CFU/ml
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 50ŘKČ20	$>10^8$
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 50TCL4	$>10^4$
<i>Pantoea agglomerans</i> DBM 3797	3.20×10^9
Směs výše uvedených 1:1:1	1.10×10^9

Shrnutí

Funkční vzorek (jeho reálná podoba viz Obr.1) valorizuje vedlejší produkt živočišné výroby (kuřecí peří) tím, že ho využívá pro přípravu kultivačního média namísto syntetického LB média. Směs endofytních bakterií byla vybrána tak, aby jednotlivé bakterie byly nejen schopné růstu v péřovém hydrolyzátu, ale zároveň disponovaly různými vlastnostmi

prospěšnými pro rostliny. Jednotlivé složky vzorku si nekladou zvláštní nároky na uchování, jejich skladování (zatím testovány 2 měsíce) vyžaduje pouze lednici nebo běžný mrazák (teplota -18 °C) a také samotná předaplikační příprava (smíchání, stání při pokojové teplotě po dobu 12-24 h a naředění vodou) je velmi jednoduchá a přípravek je možné aplikovat jak jako zálivku do půdy, tak na listy. Vzorek lze aplikovat na rostliny jako růstový stimulant a zároveň ho i využít pro doplnění zdrojů dusíku, fosforu a draslíku. Do budoucna bude testována trvanlivost při dlouhodobém skladování, možná náhrada perlitových kuliček rozložitelným materiálem jako je biouhel a zejména ve spolupráci s partnery podpora růstu rostlin po aplikaci přípravku.

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>

Patakova P, Vasylykivska M, Sedlar K, Jureckova K, Bezdicek M, Lovecka P, Branska B, Kastanek P, Krofta K. Whole genome sequencing and characterization of *Pantoea agglomerans* DBM 3797, endophyte, isolated from fresh hop (*Humulus lupulus* L.). *Front Microbiol.* 2024 15:1305338. doi: 10.3389/fmicb.2024.1305338.