

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 31 468

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A01N 59/16* (2006.01)  
*A01N 25/02* (2006.01)  
*A01P 1/00* (2006.01)  
*B82Y 99/00* (2011.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34436**  
(22) Přihlášeno: **08.12.2017**  
(47) Zapsáno: **13.02.2018**

- (73) Majitel:  
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ
- (72) Původce:  
Ing. Jakub Pečenka, Choryně, CZ  
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Lednice, CZ  
Ing. Eliška Peňázová, Šumperk, CZ  
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ

- (54) Název užitého vzoru:  
**Přípravek s obsahem nanočástic stříbra k  
eliminaci bakterie *Xanthomonas campestris*  
pv. *campestris* na semenech rostliny čeledi  
brukvovitých**

**CZ 31468 U1**

## **Přípravek s obsahem nanočástic stříbra k eliminaci bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na semenech rostlin čeledi brukvovitých**

### Oblast techniky

5 Vynález se týká přípravku s obsahem nanočástic stříbra pro ošetření semen rostlin čeledi brukvovitých, například zelí hlávkového, který díky antibakteriálním vlastnostem stříbrných nanočástic eliminuje škodlivé účinky bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

### Dosavadní stav techniky

10 Za nanočástice považuje Borm et al. (2006) částice s rozměry od 1 do 100 nm, přičemž jejich vlastnosti se liší v závislosti na materiálu, ze kterého jsou vytvořeny, na velikosti, tvaru a na jejich povrchu. Využití nanočástic v průmyslu a při výrobě komerčních produktů zaznamenává v posledních letech velký nárůst. Porozumění interakčním mechanismům na molekulární úrovni mezi nanočásticemi a biologickými systémy je však stále nedostatečné (Barrena et al. 2009). Současné s tímto trendem jsou nalézány nové cesty využití nanočástic, nicméně mnohé z nich jsou stále ve fázi testování (Ngomsik et al. 2005, Uheida et al. 2006).

15 Jednou z využitelných vlastností některých kovových nanočástic je jejich antibakteriální aktivita. Předpokládá se, že účinnost nanočástic proti bakteriím je založena na narušení funkce buněčné stěny (Ahmed et al. 2016). Antibakteriální vlastnosti stříbrných nanočástic jsou hojně využívány například při výrobě obvazových materiálů, cévních náhrad, protéz apod. Podobné účinky mají také nanočástice na bázi mědi (Giannousi et al. 2013), nebo nanočástice založené na oxidu titaničitém (Paret et al. 2013). Naproti tomu je třeba brát v potaz, že např. kovové nanočástice oxidu zinku se při jistých koncentracích ukázaly jako inhibiční v různých vývojových stádiích rostlin, jako je klíčení semen a prodlužování kořene (Hrdinová 2011). Dále je nutné brát v úvahu, že antibakteriální účinek každé nanočástice není univerzální a z hlediska účinnosti zde existuje pro daný druh patogenu významná specifita daná konkrétním typem nanočástic, jejich velikostí a koncentrací.

25 Jednou z nejdůležitějších vlastností kvalitního osiva obecně je jeho perfektní zdravotní stav z hlediska výskytu patogenních organismů, které by následně mohly ohrozit porost a v extrémním případě i celou úrodu. Mezi takovéto patogeny patří u zelí hlávkového bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (dále Xcc), která patří mezi státem sledované a regulované patogeny. Bohužel však postupů, které by při zachování vitality osiva Xcc účinně a levně eliminovaly, není známo příliš mnoho.

35 *Xanthomonas campestris* je gram-negativní karanténní bakterie, která spadá do kmene proteobakterií. Tato bakterie byla geneticky rozčleněna do více než 140 patovarů, přičemž každý patovar má odlišný okruh hostitelů. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* obvykle napadá a množí se v cévním systému brukvovitých rostlin a projevuje se charakteristickými symptomy. Mezi tyto symptomy patří tzv. černá hniloba způsobená zčernáním cévních svazů a nekróza na listech ve tvaru V, která postupuje od okrajů listů směrem k jejich středu (Park et al. 2004). Xcc se řadí mezi tzv. seed born pathogens a do rostliny vstupuje skrze hydatody, stomata, kořeny, nebo skrze poranění. Infikuje širokou škálu rostlin z čeledi brukvovitých (Brassicaceae), mezi které patří například zelí, květák, brokolice, ředkve, nebo huseníček. Tato bakterie je tedy hospodářsky významným patogenem (Williams 1980). K pravidelně se opakujícím epidemiím Xcc dochází po celém světě, nejvíce jsou napadány oblasti s vysokou teplotou a vysokou relativní vzdušnou vlhkostí. Epidemie Xcc tedy způsobuje v zemědělské produkci velmi podstatné výnosové ztráty (Qian et al. 2005). Přes rostoucí úroveň poznání nejsou v současné době známy efektivní přístupy pro eliminaci Xcc jak ze vstupního osiva, tak i v samotném porostu.

45 V užitném vzoru CZ 25632 U1 je popsán obalovací přípravek na bázi symbiotických mykorrhizních hub, škrobu a vody pro obalování semen za účelem symbiotického působení mezi rostlinou a houbou.

V přihlášce užitého vzoru PV 1992-2292 je popsán prostředek pro ošetřování semen a způsob zvyšování růstu rostlin a výtěžků použitím mikronizovaného thiaminu ve formě solí, případně s nebaktericidním fungicidem proti patogenním houbám.

5 Podobně český užité vzor č. 231194 popisuje tekutý vodný prostředek k ochraně semen před působení plísní nebo český užité vzor č. 226445 popisuje prostředek k ošetřování semen aplikací vodné suspenze s insekticidem a adhezivním lepidlem.

10 V přihlášce vynálezu PV 2011-691 A3 je popsán biocidní přípravek s nanočásticemi stříbra o velikosti 1 až 250 nm a koncentraci 1 až 2000 ppm v matrici antimikrobiálních polymerů, který může být aplikován i na nadzemní části rostlin a dále je uveden způsob přípravy takového přípravku. Přípravek, způsob přípravy i samotná aplikace takového přípravku na nadzemní části živých rostlin je však s ohledem na použití antimikrobiálních polymerů nákladná, náročná a méně dostupná.

#### Podstata technického řešení

15 Výše uvedené nedostatky odstraňuje dle tohoto technického řešení přípravek s obsahem nanočástic stříbra k eliminaci bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na semenech rostlin čeledi brukvovitých, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje nanočástice stříbra o velikosti 1 až 10 nm v koncentraci 75 až 1000 ppm a pro rostlinná pletiva netoxické rozpouštědlo.

20 Pro rostlinná pletiva jsou vhodná zejména netoxická vodná rozpouštědla, ve kterých mohou být pro delší skladovatelnost přípravku rozpuštěny látky, které vzniklý roztok nanočástic stříbra stabilizují a zároveň nepůsobí negativně na vitalitu rostlinných pletiv.

25 Výhodou použití nanočástic stříbra v roztoku rozpouštědla je nízká cena, jednoduchost přípravy i aplikace přípravku v podobě roztoku, kdy semena je na rozdíl od nadzemních částí rostliny možné tímto přípravkem upravit ještě před jejich aplikací do půdy tak, že jsou umístěna do tohoto roztoku nanočástic stříbra v pro rostliny netoxickém rozpouštědle v množství 0,1 až 20 g semen na 100 ml přípravku a výsledná směs je dále umístěna na třepačku a při otáčkách do 350 ot.min<sup>-1</sup> po dobu alespoň 1 hodiny. Poté jsou semena osušena v tenké vrstvě, například za použití filtračního papíru.

30 Ve výhodném provedení obsahuje přípravek dle tohoto technického řešení nanočástice stříbra o velikosti 1 až 10 nm v koncentraci 95 až 105 ppm, nejlépe 100 ppm, což je koncentrace, při které jsou zajištěny dostatečné antibakteriální účinky přípravku při splnění podmínky aplikace přípravku na semena na třepačce po dobu alespoň jedné hodiny. Vysoké koncentrace nanočástic nad 1000 ppm nejsou vhodné z důvodu možné fytoxicity při vyšší koncentraci stříbra, nízké koncentrace pod 75 ppm naopak nezajistí dostatečnou účinnost přípravku proti bakterii *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

35 Ve výhodném provedení mají nanočástice stříbra velikost  $9 \pm 0,1$  nm. Při testování větších nanočástic (19, 35 a 61 nm) nebyl eliminační účinek vůči *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* výrazný nebo žádný. Naopak při nižších velikostech nanočástic než 9 nm může být vysoký inhibiční účinek vůči *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* doprovázen nežádoucími fytoxicými účinky na ošetřená semena.

40 Jako rozpouštědlo pro nanočástice stříbra je ve výhodném provedení použita matrice představující reakční prostředí při přípravě těchto nanočástic, která je tvořena vodným roztokem citronanu sodného s kyselinou taninovou, výhodně o koncentraci citronanu sodného 0,05 až 1 mM v tomto roztoku a kyseliny taninové o koncentraci 0,05 až 1 mM v tomto roztoku, přičemž toto rozpouštědlo přípravek stabilizuje a zároveň splňuje nutnou podmínku nezávadnosti pro ošetřená rostlinná pletiva.

#### Příklady uskutečnění technického řešení

Uvedená uskutečnění znázorňují příkladné varianty provedení technického řešení, která však nemají z hlediska rozsahu ochrany žádný omezující vliv.

Jedním příkladem uskutečnění je přípravek pro ošetření semen hlávkového zelí k eliminaci bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* roztokem nanočástic stříbra o velikosti 9 nm a v koncentraci 100 ppm nanočástic stříbra ve vodném roztoku vzniklého smícháním citronanu sodného o koncentraci 64 mmol/l a kyseliny taninové o koncentraci 18 mmol/l. Při aplikaci tohoto přípravku bylo ke 2 ml uvedeného přípravku přidáno 0,1 g semen, směs byla promíchávána na třepačce při otáčkách 350 ot.min<sup>-1</sup> po dobu 1 hodiny. Poté byla semena důkladně osušena v tenké vrstvě za použití filtračního papíru.

Nejvhodnější koncentrace a velikosti i typ použitých nanočástic, jakožto i postup aplikace byly zjišťovány testováním pro stanovení nejvhodnějších vlastností výsledného přípravku z hlediska schopnosti inhibovat aktivitu živých kultur Xcc. Bylo použito měření optické density kultur Xcc v tekutém mediu za přítomnosti testovaných nanočástic o různých koncentracích. Spektrofotometrické měření umožnilo na základě různých hodnot času zdvojnásobit kvantifikovat rychlost růstu Xcc a umožnilo tak výběr vhodného druhu nanočástic s nejvyšším inhibičním účinkem v in vitro podmínkách. Stříbrné nanočástice o velikosti partikulí 9 nm, které v in vitro testu poskytovaly nejlepší výsledky, pak při testování na reálných osivech potvrdily své antagonistické vlastnosti vůči patogenu Xcc na uměle inokulovaných osivech zelí hlávkového.

Testování osiva proběhlo po jeho umělé inokulaci patogenem Xcc, a to namáčením 5 gramů osiva po dobu 1 hodiny v roztoku Xcc o koncentraci 1 x 10<sup>9</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> s následným osušením na vzduchu.

Pro testování byly zvoleny roztoky stříbrných nanočástic o velikosti 9 nm a koncentracích 100 ppm, 20 ppm a 2 ppm. Semena zelí byla po třiceti kusech pro každou variantu umístěna do mikrozkušavky o objemu 2 ml obsahující roztok nanočástic o dané koncentraci. Mikrozkušavky byly umístěny do horizontální polohy na třepačku a inkubovány při rychlosti 350 ot.min<sup>-1</sup> po dobu 1 a 2 hodin. Po uplynutí času byla semena několik minut sušena na vzduchu s pomocí filtračního papíru a poté převedena na klíčovadla. Jako kontrolní vzorky byla použita semena ošetřená za podmínek stejných jako v předchozím odstavci, na osivo však bylo působeno pouze rozpouštědlem použitým pro daný typ nanočástic. Pozitivní kontrolu představovala semena inokulovaná patogenem Xcc. Každá z těchto variant představovala 30 semen zelí hlávkového.

Pro testování přítomnosti Xcc v klíčících rostlinách byla použita metoda fungující na bázi detekce vybraného úseku DNA typického pro Xcc po jeho předchozím namnožení v rámci polymerázové řetězcové reakce (dále PCR). Konkrétně byla použita technika označovaná jako Real Time PCR, jejíž pomocí lze získat také informaci o koncentraci detekované DNA ve vzorku. Pro tyto účely byla z klíčících rostlin, které byly získány klíčením za světla po dobu tří dnů při teplotě 23 °C, extrahována celková DNA s využitím některého z komerčních kitů pro izolaci DNA. Vzorek pro izolaci DNA představoval vždy jednu variantu o 30 klíčících rostlinách homogenizovaných společně v třecí misce.

Na základě doby nástupu detekčního signálu od začátku analýzy, tzv. Ct hodnoty, která v nepřímé úměře odpovídá množství detekovaných úseků DNA ve vzorku, byly jednotlivé varianty hodnoceny z hlediska obsahu Xcc a u ošetřených variant také z hlediska míry účinnosti nanočástic stříbra o velikosti 9 nm v závislosti na době působení a koncentraci v aplikovaném roztoku. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

vzorek	doba inkubace	koncentrace NPs (ppm)	Ct
1	1 hodina	100	-
2		20	19,56
3		2	21,74
4		0	21,32
5	2 hodiny	100	-
6		20	22,17
7		2	21,17
8		0	21,06
9	pozitivní kontrola	0	7,15
10	rozpouštědlo bez nanočástic	0	17,68

Z tabulky vyplývá, že nejúčinnější pro eliminaci Xcc byly varianty rostlin vzešlé z osiva ošetřeného nanočásticemi o koncentraci 100 ppm, přičemž po inkubaci po dobu jedné či dvou hodin s touto koncentrací nebyl patogen Xcc vůbec detekován. Výsledky experimentu dále naznačují, že snižování koncentrace může silně ovlivnit účinnost ošetření. Další teoretickou možností je naopak zvyšování koncentrace Ag nanočástic v použitém roztoku, kde je však již možné, že takto vysoké hodnoty mohou působit fytotoxicky.

#### Průmyslová využitelnost

Popsaný přípravek s obsahem nanočástic stříbra k eliminaci bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na semenech rostlin čeledi brukvovitých je možné doporučit pro rutinní předsetřovou úpravu osiva u velkoproducentů brukvovitých zelenin a také jako preventivní i kurativní nástroj pro eliminaci patogenu Xcc v osivu, popřípadě snížení jeho výskytu u šlechtitelských firem, které osivo zelí hlávkového produkují a obchodují s ním. Tím je možné hned před distribucí do prodeje zaručit kvalitu osiva. Navržený postup je navíc možno využít uvnitř šlechtitelských firem v rámci procesu ozdravování osiva šlechtitelsky významných linií.

#### 15 Použité literární zdroje

- Ahmed, K. B. A., Raman T., Veerappan, A. 2016. Future prospects of antibacterial metal nanoparticles as enzyme inhibitor. *Materials Science and Engineering* [online], 68, 939–947 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.06.034. ISBN10.1016/j.msec.2016.06.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116306026>
- 20 Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A., Puentes, V. 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere* [online], 75(7), 850–857 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.078. ISBN 10.1016/j.chemosphere.2009.01.078. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653509001416>
- Borm, P., Klaessig, F., Landry, T., Moudgil, B., Pauluhn, J., Thomas, K. 2006. Wood, S. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part V: Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicological Sciences* [online], 90(1), 23-32 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1093/toxsci/kfj084. ISBN 10.1093/toxsci/kfj084. Dostupné z: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfj084>
- 25 Giannousi, K., Lafazanis, K., Arvanitidis, J., Pantazaki, A., Dendrinou-Samara, C. 2014. Hydrothermal synthesis of copper based nanoparticles: Antimicrobial screening and interaction
- 30

- with DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online], 133, 24–32 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2013.12.009. ISBN 10.1016/j.jinorgbio.2013.12.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013413003395>
- 5 Hrdinová, Z. 2014. *The importance of nanotechnology in food*. Brno, Bachelor Thesis. Mendel University in Brno. Supervisor: Soňa Křížková.
- Jo, Y., Kim, B., H., Jung, B. 2009. Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Disease* [online], 93(10), 1037-1043 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1094/PDIS-93-10-1037. ISBN 10.1094/PDIS-93-10-1037. Dostupné z: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-93-10-1037>
- 10 Ngomsik, A., Bee, A., Draye, M., Cote, G., Cabuil, V. 2005. Magnetic nano- and microparticles for metal removal and environmental applications: a review. *Comptes Rendus Chimie* [online], 8(6-7), 963–970 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1016/j.crci.2005.01.001. ISBN 10.1016/j.crci.2005.01.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631074805000081>
- 15 Paret, M., L., Vallad, G., E., Averett, D., R., Jones, J., B., Olson, S., M. 2013. Photocatalysis: Effect of Light-Activated Nanoscale Formulations of TiO<sub>2</sub> on *Xanthomonas perforans* and Control of Bacterial Spot of Tomato. *Phytopathology* [online], 103(3), 228-236 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1094/PHYTO-08-12-0183-R. ISBN 10.1094/PHYTO-08-12-0183-R. Dostupné z: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-08-12-0183-R>
- 20 Park, Y., J., Lee, B., M., HO-Hahn, J., Lee, G., B., Park, D., S. 2004. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific primers based on hrpF gene sequences. *Microbiological Research* [online], 159(4), 419–423 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1016/j.micres.2004.09.002. ISBN 10.1016/j.micres.2004.09.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501304000734>
- 25 Qian, W., Jia, Y., Ren, S., He., Y., Feng, J., Lu, L., Sun, Q., Ying, G., Tang, D., Wu, H., T., W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B., Zeng, S., Gu, W., Lu, G., Rong, Li., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G., Tang, J., He C. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research* [online], 6(9), 757-767 [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1101/gr.3378705. ISBN 10.1101/gr.3378705. Dostupné z: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.3378705>
- 30 Uheida, A., Iglesias, M., Fontàs, C., Hidalgo, M., Salvadó, V., Zhang, Y., Muhammed, M. 2006. Sorption of palladium(II), rhodium(III), and platinum(IV) on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* [online], 301(2), <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00219> [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.05.015. ISBN 10.1016/j.jcis.2006.05.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706004176>
- 35 Williams, P.,H. 1980. Black Rot: A Continuing. *Plant Disease* [online], 64(8), 736-742 [cit. 2016-09-15]. Dostupné z: <http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1980Articles/PlantDiseas>  
e64n08\_736.pdf
- 40

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Přípravek s obsahem nanočástic stříbra k eliminaci bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na semenech rostlin čeledi brukvovitých, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje nanočástice stříbra o velikosti 1 až 10 nm v koncentraci 75 až 1000 ppm a pro rostlinná pletiva netoxické rozpouštědlo.
- 45

2. Přípravek s obsahem nanočástic stříbra dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje nanočástice stříbra v koncentraci 95 až 105 ppm.
3. Přípravek s obsahem nanočástic stříbra dle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že obsahuje nanočástice stříbra o velikosti  $9 \pm 0,1$  nm.
- 5 4. Přípravek s obsahem nanočástic stříbra dle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že pro rostlinná pletiva netoxickým rozpouštědlem je vodný roztok citronanu sodného ve směsi s kyselinou taninovou.
- 10 5. Přípravek s obsahem nanočástic stříbra podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že pro rostlinná pletiva netoxické rozpouštědlo obsahuje citronan sodný o koncentraci 0,05 až 1 mM a kyselinu taninovou o koncentraci 0,05 až 1 mM.

---

Konec dokumentu

---