



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.20

(21) Номер заявки
201990201

(22) Дата подачи заявки
2017.10.16

(51) Int. Cl. *A01N 63/04* (2006.01)
A01N 25/22 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)

(54) ЖИДКИЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОТИВОГРИБКОВЫЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ МИКРООРГАНИЗМ *Pythium oligandrum*, И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) PV 2016-645; PV 2017- 661

(32) 2016.10.14; 2017.10.16

(33) CZ

(43) 2019.08.30

(86) PCT/CZ2017/000064

(87) WO 2018/068774 2018.04.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БИОПРЕПАРАТЫ, СПОЛ. С Р.О. (CZ)

(72) Изобретатель:
Суханек Мартин, Моравец Ян, Ванек
Томаш, Штипек Адам (CZ)

(74) Представитель:
Виноградов С.Г. (BY)

(56) Anon.: "Polyversum", United States Environmental Protection Agency 1 January 2010 (2010-01-01), pages 1-24, XP55465106, Retrieved from the Internet: URL: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/081606-00001-20080923.pdf [retrieved on 2018-04-06] pages 3, 5, 7 pages 14, 15

T. Milofsky: "Biopesticide Registration Action Document for *Pythium oligandrum* DV 74", 7 March 2007 (2007-03-07), pages 1-28, XP55465094, Retrieved from the Internet: URL: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-028816_7-May-07.pdf [retrieved on 2018-04-06] page 4, lines 1-21, page 7

Anon.: "Pythium oligandrum Strain M1", Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products Evaluation of active substances, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 1-36, XP55464913, Retrieved from the Internet: URL: <http://dissemination.echa.europa.eu/Biocides/>

ActiveSubstances/1442-10/1442-10_Assessment_Report.pdf [retrieved on 2018-04-05] page 4

J. VALLANCE ET AL.: "Influence of *Pythium oligandrum* Biocontrol on Fungal and Oomycete Population Dynamics in the Rhizosphere", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, no. 14, 15 May 2009 (2009-05-15), pages 4790-4800, XP55346617, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.02643-08, abstract, page 4791, right-hand column, lines 48-54

LECOMTE CHARLINE ET AL.: "Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review", BIOLOGICAL CONTROL, SAN DIEGO, CA, US, vol. 101, 15 June 2016 (2016-06-15), pages 17-30, XP029694838, ISSN: 1049-9644, DOI: 10.1016/J.BIOCONTROL.2016.06.004, abstract, *Pythium oligandrum* M1; page 24; table 2

BOZENA CWALINA-AMBROZIAK ET AL.: "The effect of biological and chemical control agents on the health status of the very early potato cultivar Rosara", JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH, vol. 55, no. 4, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 389-395, XP55465089, DOI: 10.1515/jppr-2015-0052, abstract, page 390, left-hand column, lines 32-35

US-A-4259317

JP-A-2010143876

WO-A1-2011054322

M.P. MCQUILKEN ET AL.: "Oospores of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* bulk-produced in liquid culture", MYCOLOGICAL RESEARCH, vol. 94, no. 5, 1 July 1990 (1990-07-01), pages 613-616, XP55464880, GB, ISSN: 0953-7562, DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80661-8, cited in the application, abstract, page 613, left-hand column, line 1 - page 614, left-hand column, line 41

N. BENHAMOU ET AL.: "Pythium oligandrum: an example of opportunistic success", MICROBIOLOGY, vol. 158, no. Pt 11, 13 September 2012 (2012-09-13), pages 2679-2694, XP55346605, GB, ISSN: 1350-0872, DOI: 10.1099/mic.0.061457-0, the whole document

(57) В изобретении представлен жидкий биологический противогрибковый препарат, содержащий микроорганизм *Pythium oligandrum*, включающий стабилизированную суспензию микроорганизма *Pythium oligandrum*, содержащую 0,05-10,0 вес.% культивированной биомассы микроорганизма *Pythium oligandrum*, включающей среду культивирования, клеточные формы указанного микроорганизма и вещества, продуцируемые указанным микроорганизмом, и 90,0-99,95 вес.% стабилизатора, при этом предварительно заданное количество dormantных ооспор в 1 мл указанного жидкого биологического противогрибкового препарата после стандартной нормализации находится в пределах от 1×10^3 до 2×10^7 . Жидкий биологический противогрибковый препарат, содержащий микроорганизм *Pythium oligandrum*, включающий стабилизированную

суспензию микроорганизма *Pythium oligandrum*, содержит 0,05-10,0 вес.% культивированной биомассы микроорганизма *Pythium oligandrum*, включающей среду культивирования, клеточные формы указанного микроорганизма и вещества, продуцируемые указанным микроорганизмом; и 79,77-99,95 вес.% стабилизатора, при этом остальная часть содержит до 100 вес.% по меньшей мере одно модифицирующее/вспомогательное вещество, выбранное из группы, включающей наполнитель, ароматизатор и витамин; при этом предварительно заданное количество dormantных ооспор в 1 мл указанного жидкого биологического противогрибкового препарата после стандартной нормализации находится в пределах от $2,5 \times 10^4$ до $1,0 \times 10^6$. Микроорганизм *Pythium oligandrum* представляет собой штамм *Pythium oligandrum* Dreschler ATTC 38472, депонированный в Чешской коллекции микроорганизмов (CCM) в Масариковом университете в Брно под наименованием *Pythium oligandrum* M1. Стабилизатор может представлять собой воду, солевой раствор, масло или концентрированный раствор осмолитов. В изобретении также представлен способ получения указанного жидкого биологического противогрибкового препарата.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к жидкому биологическому противогрибковому препарату, содержащему микроорганизм *Pythium oligandrum*.

Настоящее изобретение также относится к способу получения указанного препарата.

Предпосылки к созданию изобретения

За последние десятилетия химические противогрибковые препараты вызывают постоянно растущую обеспокоенность с точки зрения их негативного воздействия на окружающую среду и, безусловно, на пользователей. Тем не менее, можно утверждать, что работа по замене указанных препаратов эффективными биологическими препаратами, созданными на основе микробов, способными целенаправленно и тщательно уничтожать плесень, не велась в требуемом объеме. В настоящее время для указанной цели зарегистрировано только 14 типов микробов в странах ЕС, и это несмотря на интенсивные исследования, как подчеркивалось в недавно опубликованной статье Gerbore et al., 2014[1].

Практическое применение биологического препарата, в котором используется противогрибковое воздействие микроорганизма *Pythium oligandrum*, известно с 1970-х годов прошлого века, и в данном случае мы можем сослаться на классические работы Dreschler [2], 1943 г. и Deacon [3], 1976 г., посвященные биологии указанного микроорганизма и содержащие описание его микопаразитических свойств. Именно в то время нами был получен патент США № 4259317 [4], авторы Veselý и Hejránek, дата приоритета 5.7.1978, в котором раскрываются препараты на основе сухого порошка, содержащие ооспоры *Pythium oligandrum* Dreschler, для защиты от вызванных плесенью заболеваний, поражающих всходы сахарной свеклы, при этом содержание ооспор в препарате составляет минимально 1 млн ооспор на 1 г препарата, и при этом количество ооспор в пределах от 50 до 500 млн на 1 г препарата, как утверждается, является оптимальным. В качестве соответствующей альтернативы препаратам на основе сухого порошка авторы настоящего изобретения принимают жидкую суспензию ооспор, однако указывают на ряд недостатков применения приготовленного ими препарата, в частности, нестабильность таких препаратов, ограничивающая их практическое применение сроком приблизительно до 2-х недель. После более длительного периода времени происходит неприемлемое уменьшение количества образующихся ооспор вследствие аутолиза или загрязнения сверхпаразитами, в то время как количество ооспор является существенным фактором при применении механизма микопаразитической защиты. Что касается источника отдельных штаммов *Pythium oligandrum*, авторы Baker и Lifshitz отметили в своем патенте США 4574083 [5] возможность получения регионально подходящих штаммов путем их выделения из почвы в соответствии со стандартным опубликованным способом. Со временем указанный способ был признан, и в настоящее время в государственных коллекциях находятся штаммы из различных географических регионов. Для определения изолятов в то время в основном применялись следующие биологические критерии: скорость роста, оптимальная температура роста - как правило, приблизительно 30°C и морфология отдельных репродуктивных форм полового и неполового цикла. С этой точки зрения последующий патент можно рассматривать как инновационный; в указанном патенте изобретатель Martin, патент США № 5961971 [6], приводит молекулярную характеристику отдельных изолятов на основе точного протокола последовательностей важнейших генов. В этом же патентном документе подробно представлены отдельные составы и способы применения микроорганизма *Pythium oligandrum* в полевых условиях, при этом жидкие составы после их выращивания на недорогостоящей среде с использованием промышленных отходов и порошковые составы, приготовленные путем инкапсулирования биомассы, высушенной после ферментации для их превращения в альгинаты, либо в виде высушенного и измельченного материала, упомянуты в патентном документе в качестве предпочтительных составов. Составы в форме смачиваемых порошков, стандартных порошков, эмульсифицированных масел и гранул представляют собой еще один вид возможных составов. В патенте CZ 303 908 и в соответствующем патенте EP 2503892 [7], BIOPREPARÁTY, spol. s.r.o., 2009 г. основное внимание уделено послеуборочной защите сельскохозяйственных культур с использованием микроорганизма *Pythium oligandrum*. В технологическом разделе патента акцент сделан на культивировании указанного микроорганизма в стандартных ферментерах на жидкой среде, в которой содержатся злаковые культуры без добавления других питательных веществ. Подчеркивается возможность получения чистого концентрата ооспор без присутствия истощенной питательной среды или остатков мицелия, которые удаляют в процессе сушки в распылительной сушилке на последних этапах производственного процесса. Публикация сведений о приготовлении ооспор организмов кроме *Pythium oligandrum* была ограниченной. В заявке на патент CN 102807957A [8], Liu X. et al., 2012 г. приведено описание препарата из образующихся ооспор микроорганизма *Phytophthora capsici* с целью контроля сопротивляемости различным лекарственным средствам или для проведения генетических исследований. Жидкие препараты, предназначенные для биологической защиты растений, указаны в заявке на патент США № 2014/0212387 [9], Lüth, 2014 г., хотя они представляют собой исключительно жидкие препараты, в которых используются полиэферы модифицированных тризилоксанов в качестве растворителей.

Кроме того, в непатентной литературе в определенном объеме рассматривается вопрос приготовления и стабилизации ооспор и иных репродуктивных форм микроскопических оомицетов *Pythium oligandrum*. В 1990 г. McQuilken et al. [10] опубликовал простой и воспроизводимый способ получения ооспор

в жидкой культуре с использованием мелассы в качестве экономически доступного субстрата. Тем не менее, вопрос об идеальном способе поддержания жизнеспособности приготовленных ооспор не был удовлетворительно решен ни в патентной, ни в непатентной литературе. В 1992 г. McQuilken et al. [11] проводил наблюдение за влиянием различных осмотиков, таких как глицерин, NaCl и KCl, на скорость разрастания гиф в радиальном направлении и образования ооспор оомицетов *Pythium oligandrum* путем сравнения с осмотическим давлением, представленным почвенным экстрактом при -0,5 МПа. Добавление осмолитов способствовало снижению скорости разрастания в радиальном направлении, однако не оказывало влияния на образование ооспор до значения давления приблизительно -2,0 МПа. Авторы пришли к заключению, что высокая эффективность применимых ооспор может быть достигнута при естественных осмотических условиях на участках применения в случае удовлетворения условий с точки зрения оптимальной температуры, составляющей, как правило, 30°C, и значений кислотности, составляющих pH 6,0-7,5. С точки зрения стабильности при хранении полученных ооспор авторами Takenaka и Ishikawa [12], 2013 г. отмечена их высокая эффективность в течение периода времени до 379 дней при хранении стандартной приготовленной суспензии в дистиллированной воде в холодильнике при 4°C.

По утверждению экспертов основное препятствие на пути более широкого распространения препаратов биологической защиты совершенно очевидно заключается в зависимости эффективности от конкретных условий применения и решении практических проблем, связанных с сохранением и приготовлением биологических препаратов для защиты растений в области растениеводства. По этой причине решение практических проблем, связанных с простым и эффективным применением ооспор *Pythium oligandrum*, является исключительно важным для достижения коммерческого успеха биологических препаратов. С целью решения указанной проблемы было бы желательным разработать жидкие средства биологической защиты, характеризующиеся долгосрочной стабильностью даже при стандартных условиях хранения. Тем не менее, опубликованные до настоящего времени решения имеют ряд недостатков, которые не были успешно устранены даже после нескольких лет интенсивной исследовательской работы. Большинство способов, использовавшихся в процессе приготовления в лабораторных условиях биологических препаратов, предназначенных для защиты растений, являются сложными и контролируемые исключительно на лабораторном уровне, что существенно ограничивает использование таких способов в области промышленного производства таких препаратов. До настоящего времени предпочтительный способ применения (в форме смачивающихся порошков), который был использован в препаратах, приготовленных чешской биотехнологической компанией Biopreparáty, spol s.r.o. (Polyversum®, Polygandron, BIOPEL®) и реализуемых по всему миру, не лишен своих собственных недостатков с точки зрения выбора цели защитных мер и защиты пользователей. До сих пор не был опубликован простой, эффективно испытанный и последовательно определенный способ для создания композиции с достаточной стабильностью при хранении приготовленных репродуктивных форм микроорганизма *Pythium oligandrum*, или ооспор в простой форме, которые беспрепятственно могут быть использованы в промышленности.

Краткое изложение существа изобретения

Известные недостатки применяемых до настоящего времени биологических противогрибковых препаратов устранены или ограничены в соответствии с настоящим изобретением, сущностью которого является жидкий биологический противогрибковый препарат, содержащий микроорганизм *Pythium oligandrum* в соответствии с независимым пунктом 1 формулы изобретения, включающий стабилизированную суспензию *Pythium oligandrum*, и содержащий 0,05-10,0 вес.% культивированной биомассы микроорганизма *Pythium oligandrum*, содержащей среду культивирования, клеточные формы указанного микроорганизма и вещества, продуцируемые указанным микроорганизмом; и 90,0-99,95 вес.% стабилизатора; при этом количество дормантных ооспор в 1 мл указанного жидкого биологического противогрибкового препарата должно находиться в увеличенном диапазоне от 1×10^3 до 2×10^7 после проведения стандартной нормализации.

Сущность жидкого биологического противогрибкового препарата, содержащего микроорганизм *Pythium oligandrum* в соответствии со 2-м независимым пунктом формулы настоящего изобретения, заключается в том, что препарат включает стабилизированную суспензию *Pythium oligandrum* и содержит: 0,05-10,0 вес.% культивированной биомассы микроорганизма *Pythium oligandrum*, содержащей среду культивирования, клеточные формы указанного микроорганизма и вещества, продуцируемые указанным микроорганизмом; 79,77-99,95 вес.% стабилизатора; при этом оставшаяся часть до 100 вес.% составляет по меньшей мере одно модифицирующее/вспомогательное вещество, выбранное из группы, включающей наполнитель, ароматизатор, витамин Е; при этом количество дормантных ооспор в 1 мл указанного жидкого биологического противогрибкового препарата должно находиться в увеличенном диапазоне от $2,5 \times 10^4$ до $1,0 \times 10^6$ после проведения стандартной нормализации.

Предпочтительным является штамм *Pythium oligandrum* Dreschler ATTC 38472 микроорганизма *Pythium oligandrum*, депонированный в Чешской коллекции микроорганизмов (ССТМ) в Масариковом университете в Брно под наименованием *Pythium oligandrum* M1.

Основное преимущество настоящего изобретения заключается в создании нового жидкого биологи-

ческого противогрибкового препарата, подходящего для долгосрочного использования и достижения своего длительного и существенного эффекта стабилизации, при этом используемые стабилизаторы являются доступными и обеспечивают дополнительное преимущество при защите консервированной биомассы микроорганизма *Pythium oligandrum* от микробного загрязнения. Указанное выше заявленное содержание dormantных клеток микроорганизма в форме ооспор предусматривает получение практически протестированного и экономически доступного предмета исследования, упрощающего дозирование препарата для его применения в широком диапазоне областей. При этом могут быть использованы различные типы биомассы, переработанной с использованием подходящего препарата. Более низкие концентрации dormantных ооспор, например, при десятках и сотнях dormantных ооспор, также обеспечивают достижение определенных результатов, хотя эффективность указанного препарата будет ниже. Предварительно заданное количество dormantных ооспор при необходимости может быть отрегулировано путем стандартной нормализации, т.е. путем разбавления или концентрирования до требуемого значения.

Предпочтительно, чтобы стабилизатор содержал по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, включающей воду, солевой раствор, масло либо растворы осмолитов, которые могут представлять собой раствор полиола, типа сахара или сахаридного спирта, либо солевые растворы. Растворы полиола могут быть выбраны из группы, включающей метаболизируемые и неметаболизируемые растворы различных олигосахаридов, включающих максимально 10 сахаридных единиц и минимально 2 сахаридные единицы таким образом, чтобы обеспечивалось использование мальтодексаозы, либо мальтоноаозы, либо мальтооктаозы, либо мальтогексаозы, либо мальтопентаозы, либо стахиозы, либо рафинозы, либо сахарозы, либо сукралозы, либо разветвленных сахаридов.

В идеальном исполнении стабилизатор представляет собой воду в количестве, например, от 30,0 до 99,9 вес.%, либо солевой раствор в количестве, например, 99,9 вес.%, либо осмолит в форме сахарозы в количестве, например, от 60,0 до 64,95 вес.%, либо по меньшей мере одно из масел, выбранное из группы, включающей парафиновое масло, минеральное масло, глицерин, подсолнечное масло, в количестве, например, 79,77-99,9 вес.%.

Жидкий биологический противогрибковый препарат может содержать другие модифицирующие или вспомогательные вещества для конкретных областей применения, такие как биоразлагаемая матрица пролонгированного действия, такая как носитель ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum*, например, поливиниловый спирт в количестве, например, 16,0 вес.%; либо наполнитель на основе оксида кремния в количестве, например, 16,0 вес.%; либо иные вспомогательные/модифицирующие вещества, такие как шалфейный или мятный ароматизатор в количестве, например, 0,96 вес.%, или витамин Е в количестве, например, 0,4 вес.%.

Использование таких вспомогательных/модифицирующих веществ зависит от области применения биологического противогрибкового препарата.

Следовательно, в стабилизированной суспензии ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* может найти применение широкий диапазон стабилизирующих веществ гидрофильного или гидрофобного характера, таких как широко используемые вода или масло, либо растворы различных доступных осмолитов.

Осмолиты благодаря своим химическим свойствам могут быть идеально адаптированы для требуемой конкретной области применения, так как было продемонстрировано, что осмолиты, такие как растворы различных солей, могут проявлять ионный характер, либо как растворы полиолов - неионный характер. Преимуществом является тот факт, что полиолы могут быть представлены, например, метаболизируемыми и неметаболизируемыми растворами различных определенных олигосахаридов, приемлемыми для ряда областей практического применения, так как смеси соответствующих природных или синтетических веществ, обладающих требуемыми свойствами, могут быть использованы для указанной цели. Наиболее широко распространенное вещество, такое как сахароза, также может быть преимущественно использовано, однако при необходимости могут быть использованы даже широко распространенные неметаболизируемые аналоги. Композиция жидких суспензий совместима с широким диапазоном других веществ, способных модифицировать их полезные свойства или изменить области применения в форме антиоксидантных веществ, природных активаторов и витаминов, например, оксида кремния в качестве наполнителя, ацетата (витамина Е) и иных веществ.

Было неожиданно обнаружено, что если определенный процент клеток, полученных путем культивирования в жидкой фазе или на твердом субстрате, по завершении процесса приготовления представляет собой суспензию или концентрированную суспензию, репродуктивные формы микроорганизма *Pythium oligandrum* сохраняют свою первоначальную способность к прорастанию в такой суспензии, по меньшей мере, в течение шести месяцев при хранении в стандартных лабораторных условиях при нормальной температуре. Указанный результат становится еще более показательным при рассмотрении нами невоспроизводимых и непостоянных результатов, представленных в опубликованной литературе. В литературе, например, утверждается, что ооспоры в суспензии, приготовленной в дистиллированной воде и хранящейся в течение 188 или 384 дней, сохраняли первоначальную способность к прорастанию при хранении в холодильнике при 4°C. Тем не менее, практически полное отсутствие описания способа приготовления таких описанных препаратов не позволяет провести оценку их научной достоверности, не

говоря уже об их практической применимости, когда в рабочих условиях на фермах могут отсутствовать возможности обеспечения температуры хранения на уровне 4°C.

Жидкий биологический противогрибковый препарат, содержащий микроорганизм *Pythium oligandrum* получают, используя способ приготовления в соответствии с настоящим изобретением, суть которого заключается в том, что жидкую среду, включающую экстракт зерновых злаков, тростниково-сахарную мелассу и другие необходимые питательные вещества, стерилизуют в паровом стерилизаторе путем аэробного культивирования оомицета *Pythium oligandrum* в жидкой фазе. После охлаждения среду инокулируют одним из выбранных штаммов *Pythium oligandrum*. Биомассу собирают и обрабатывают после завершения процесса культивирования, который занимает несколько дней, предпочтительно 13 дней. После завершения этапа культивирования *Pythium oligandrum* в жидкой фазе биомассу гомогенизируют жидкой средой таким образом, чтобы размер по меньшей мере 95% частиц в суспензии находился в пределах от 0,050 до 0,300 мм, предпочтительно 0,125 мм. Гомогенную суспензию, характеризующуюся определенным количеством ооспор, концентрировали или разбавляли в зависимости от количества ооспор в растворе до предварительно заданной концентрации ооспор в биологическом противогрибковом препарате. Суспензию предпочтительно фильтровали после этапа гомогенизации и концентрации или разбавления.

Водную суспензию стабилизируют в процессе гомогенизации добавкой осмолита и хранят в стерильном контейнере большого объема при температуре ниже 8°C.

В части, касающейся безводной суспензии микроорганизма *Pythium oligandrum*, материал, полученный после завершения этапа культивирования на твердофазном субстрате или в жидкой фазе, гомогенизировали до достижения значения размера по меньшей мере 95% частиц в суспензии в пределах от 0,050 до 0,300 мм, предпочтительно 0,125 мм. Полученную гомогенную суспензию, характеризующуюся определенным количеством ооспор, центрифугировали. После удаления надосадочной жидкости в центрифугированный материал добавляли масло для достижения предварительно заданной концентрации ооспор для приготовления биологического противогрибкового препарата в таком количестве, чтобы конечная концентрация ооспор в биологическом противогрибковом препарате соответствовала требуемой концентрации, и полученный таким способом материал далее ресуспендировали путем гомогенизации.

Представленное решение вопроса, по всей вероятности, является приемлемым даже с точки зрения существенного упрощения биотехнологического процесса получения микроорганизма *Pythium oligandrum*, и, таким образом, также с точки зрения существенного снижения текущих расходов на получение такой продукции. Фильтрация или отделение культивированной биомассы от среды для приготовления биомассы, ее сушка и последующее измельчение до требуемого размера частиц включает ряд относительно энергоемких и технологически трудоемких процессов, сложно контролируемых и приводящих к возможному загрязнению материала, что, в конечном счете, может привести к существенному повреждению конечного продукта, если указанные процессы не будут проводиться в рамках четко определенных и неукоснительно соблюдаемых жестких условий промышленного производства. В противоположность этому технологически нетрудоемкая суспензия биомассы, получаемая в виде плотного и вязкого растворов осмолитов, обеспечивает получение исключительно стабильного продукта, непосредственно подходящего для практического применения в ряде областей. С практической точки зрения это является существенным преимуществом, заключающимся в том, что приготовленная суспензия микроорганизма *Pythium oligandrum* может быть практически безотходно перенесена из чашек для культивирования или ферментеров, что позволяет минимизировать издержки по их очистке и техническому обслуживанию, а также снизить до минимума вероятность утечки продукта в рабочую среду производственных помещений. Более того, следует учитывать тот факт, что получение таким способом препарата, сохраняющего стабильность в течение длительного периода времени даже при хранении при нормальных температурах, также позволяет значительно сократить текущие расходы и упростить обращение с препаратом.

Кроме того, неожиданно было обнаружено, что кроме стабилизирующего эффекта концентрированных растворов осмолитов, консервирующий эффект таких растворов, хорошо известный из производственной и общепринятой практики, является существенным фактором в конкретном случае исследуемых нами суспензий ооспор микроскопического оомицета *Pythium oligandrum*. Таким образом, препарат, хранящийся при таких условиях, защищен от загрязнения нежелательными микроорганизмами, которые даже в исключительно маловероятном случае их проникновения в среду таких стабилизированных суспензий неспособны воспроизводиться в предлагаемой химической среде и, следовательно, не могут загрязнить конечный продукт. Указанное преимущество является основополагающим в существующей производственной практике, в частности, в свете предъявление все более ужесточающихся требований к уровню случайного загрязнения пестицидами, биоцидами и продуктами косметического производства.

Дополнительно к функции стабилизатора и функции консервирующего вещества растворы осмолитов также выполняют роль адгезива, - свойство, благодаря которому препарат может найти практическое применение во многих областях, либо в форме водных растворов после разбавления стабилизированных суспензий ооспор до оптимальной концентрации для их применения в качестве пропиточного материала, либо для нанесения путем распыления мелкодисперсной среды микроскопических частиц (так называемое туманообразование). Таким образом, во всех указанных выше примерах применения растворы по-

лиола способствуют эффективной адгезии препарата и последующему равномерному нанесению на обрабатываемые участки, растения или сельскохозяйственные культуры.

Следует отметить последнее, но не менее важное, что в части, касающейся использования метаболизируемых осмолитов, указанные вещества могли бы выступать в качестве питательного вещества, что является существенным в процессе колонизации и заселения целевых участков непосредственно на участках применения, при этом указанные питательные вещества являются исключительно важными, в частности, во время первого этапа, связанного с преобразованием ооспор в форму мицелия. Они также далее могут выполнять функцию питательных веществ, являющихся необходимыми для длительного роста и сохранения микроскопического оомицета *Pythium oligandrum* на участке применения питательного вещества более сложного характера, представленного недостаточно полно ферментированным субстратом, используемым в процессе биотехнологического роста и воспроизводства ооспор в процессе биотехнологического культивирования.

Конкретное содержание ооспор и иных репродуктивных форм микроскопических оомицетов в суспензиях в соответствии с представленным решением сравнимо с содержанием ранее прошедших испытания и реализуемых на рынке порошкообразных препаратов или превышает его, что является важным с точки зрения логистики и экономики распространения приготовленного таким образом препарата. Тем не менее, также имеются возможности использовать новый состав при более низких концентрациях по сравнению с предыдущим решением.

Фактически мы обнаружили значительное уменьшение сложности композиции нового жидкого биологического противогрибкового препарата, обусловленное используемым технологическим процессом, без увязки с какими-либо ограничениям функциональности или эффективности жидкого препарата, лекарственная форма которого была получена с использованием указанного способа. Что касается клеточного и гранулометрического состава нового предлагаемого препарата, то в него практически полностью входят стабилизированные ооспоры с исключительно низким процентом мицелиальных фрагментов, молотого проса и других компонентов. Указанные компоненты безусловно не оседают в плотной среде, созданной концентрированными осмолями, которые, однако обеспечивают хорошую гомогенность препарата, несравнимо более высокую, чем в случае со смачиваемыми порошками, применяемыми в форме водных суспензий, при этом препарат был исключительно неоднородным с точки зрения размера частиц, находящихся в суспензии. Это, в частности, относится к частицам оксида кремния, содержащимся в препаратах, изготавливаемых до настоящего времени; в противоположность этому решение в соответствии с представленным изобретением не предусматривает использование оксида кремния в большинстве случаев (за исключением зубной пасты, в которой он используется в качестве абразива). Следовательно, с точки зрения требований к практическому применению исключается забивание фильтров и другого технологического оборудования при применении препарата.

Если присутствие меньшего количества метаболизируемых осмолитов является негативным фактором в определенных областях применения, указанные метаболизируемые осмолиты могут быть без проблем заменены химически идентичными неметаболизируемыми осмолитами, никоим образом не оказывающими воздействие на важнейшие свойства препарата.

Если с технологической точки зрения более приемлемым является процесс сушки полученного препарата, судя по всему, в данном случае сублимационная сушка (лиофилизация) является подходящим процессом в высоковакуумном аппарате, т.к. использование концентрированных растворов осмолитов в качестве криоконсервантов и защитных веществ в процессе лиофилизации хорошо известно и широко распространено. В качестве примера мы ссылаемся на осмолиты, широко используемые в качестве защитных криоконсервантов в ряде областей применения, требующих особого внимания, включая криоконсервацию человеческих ооцитов, описанных, например, в статье Wright [15], 2004 г.

Существенное преимущество препаратов, полученных в соответствии с представленным изобретением, заключается в том, что такие препараты являются подходящими для всех областей применения, в которых было бы предпочтительным использовать противоплесневые, микопаразитические, элиситорные и ростовые свойства микроорганизма *Pythium oligandrum*. Таким образом, в частности, использование указанного препарата в качестве растительного биофунгицида для использования в клинической и ветеринарной медицине микроорганизма *Pythium oligandrum* для разрушения биопленок и устранения дисбиоза, возникающего в случае различных заболеваний, а также для защиты здоровья населения от воздействия плесени, образующейся в жилой и/или производственной среде является целесообразным. В зависимости от матриц, используемых в концентрате жидкой суспензии, препарат может быть использован в качестве защитного спрея для растений в присутствии разлагаемого биополимера, который выступает в качестве защитного фактора и постепенно разлагаемой матрицы, под которой понимается "носитель" биологического препарата Polyversum с ооспорами активного микроорганизма *Pythium oligandrum*.

Защита от плесени, грибов, патогенных бактерий и дрожжевых грибов с использованием стабилизированной, концентрированной суспензии ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum*, предусматривающая нанесение такой стабилизированной, концентрированной суспензии в неразбавленной или разбавленной форме на участок, пораженный плесенью, либо грибами, либо патогенными бактериями, либо патогенными дрожжевыми грибами, либо микробным дисбиозом, позволяет определить широкий

диапазон областей применения для стабилизированного жидкого концентрата.

В сфере защиты растений композиция может быть использована для обеспечения защиты от плесени, грибов или патогенных бактерий и дрожжевых грибов таким образом, чтобы стабилизированная концентрированная суспензия, в разбавленной или неразбавленной форме, наносилась на растения или прилегающую к ним территорию, либо на семена, сельскохозяйственные культуры, либо фрукты, либо до сбора урожая, либо после сбора урожая, например, в складских помещениях; указанная защита предусматривает применение аэрозолей, саморастворимых капсул, содержащих концентрированную суспензию, дополнительную подкормку удобрениями у корня растения, пропитку, опрыскивание, протравливание, аэрозольное орошение сельскохозяйственных культур, внесение удобрений и дополнительных удобрений в виде компонента комплексных удобрений, а также применение в форме гидропоники.

При защите ротовой полости стабилизированная, концентрированная суспензия в разбавленной или неразбавленной форме может быть применена на участке, пораженном микробным налетом в полости рта или болезнью тканей пародонта, при возникновении инфицированных незаживающих ран, в частности, у диабетических пациентов, при возникновении инфекционных заболеваний, вызванных дерматофитами и дрожжевыми грибами, а также при возникновении других симптомов, связанных с микробным дисбиозом кожи и поверхностных мембран в организме человека.

При использовании препарата в целях защиты здоровья населения стабилизированную концентрированную суспензию в разбавленной или неразбавленной форме наносят на участки стен и кирпичной кладки, пораженные грибом. Иные новые области применения включают противогрибковую защиту охлаждающего оборудования, оборудования для кондиционирования воздуха, районов, пострадавших от наводнений и подтопления, а также иных мест, в которых наблюдается частое образование грибов, являющихся целевым объектом воздействия микроорганизма *Pythium oligandrum*.

Краткое описание чертежей

Ниже приведено подробное описание настоящего изобретения на его иллюстративных примерах осуществления, и дано подробное пояснение со ссылкой на прилагаемые чертежи.

На фиг. 1А-1С более детально рассматривается сравнение скорости роста фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* при отсутствии микроорганизма *Pythium oligandrum* и в присутствии указанного микроорганизма.

На чертежах, в частности, проиллюстрировано следующее:

фиг. 1А - рост колонии фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* без добавок (квадраты) и при одновременном инокулировании *Pythium oligandrum* из dormantных ооспор и при культивировании в жидкой фазе и на твердом субстрате (звездочки и треугольники);

фиг. 1В - снимок 4, примеры чашек Петри, на которых микроорганизм *Pythium oligandrum* из dormantных ооспор был инокулирован на левой стороне и фитопатогенные грибки *Fusarium graminearum* (верхний ряд) на правой стороне, и на контрольных чашках были инокулированы только грибки *Fusarium graminearum*, при этом рост был зарегистрирован через 4 дня;

фиг. 1С - снимок чашек Петри при одновременном инокулировании микроорганизма *Pythium oligandrum* из dormantных ооспор фитопатогенного грибка *Fusarium graminearum*, при этом рост был зарегистрирован через 11 дней.

Фиг. 2А-2С - результаты лабораторных экспериментов роста пшеницы в присутствии фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum*, микроорганизма *Pythium oligandrum* и комбинации указанных двух микроорганизмов.

На чертежах, в частности, проиллюстрировано следующее:

фиг. 2А - конические колбы Эрленмейера, в которых пшеницу проращивали на агаризованной почве в присутствии только фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum*, маленькие точки белого цвета, зарегистрированные через 20 дней инокулирования при прорастании пшеницы;

фиг. 2В - конические колбы Эрленмейера, в которых пшеницу проращивали на агаризованной почве в присутствии как фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum*, так и микроорганизма *Pythium oligandrum*; колбы фотографировали через 20 дней одновременного инокулирования при прорастании пшеницы;

фиг. 2С - конические колбы Эрленмейера, в которых пшеницу проращивали на агаризованной почве в присутствии только микроорганизма *Pythium oligandrum*; колбы фотографировали через 20 дней инокулирования указанных грибов при прорастании пшеницы.

Фиг. 3А-3Е - применение противогрибкового препарата для защиты растений в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 и последующий анализ динамики развития популяции микроорганизма *Pythium oligandrum*, наблюдаемой в ходе проведения эксперимента в полевых условиях на пшенице и окружающей ее почве, включая реакцию на присутствие грибка, контролируемую экспрессией гена и генетическими наблюдениями за уровнем грибкового загрязнения.

На чертежах, в частности, проиллюстрировано следующее:

фиг. 3А - содержание микроорганизма *Pythium oligandrum*, определенное методом генетического тестирования на растениях (светло-серая колонка) и в окружающей почве (темно-серая колонка) через различные периоды времени после применения;

фиг. 3В - увеличение уровней температуры, измеренной с использованием инфракрасного термометра непосредственно в полевых условиях в момент отбора проб (светло-серая колонка) и регистрация температурных данных, выполненная местной метеорологической станцией (темно-серая колонка);

фиг. 3С - курс экспрессии гена для целлюлозы (POCELL), эндо-бета-глюканазы (POENDO) и структурного белка, богатого серином и треонином (POSTRU) в отдельных частях растения и в окружающей его почве (So - почва, R - корень, St - стебель, L - лист), наблюдаемый в период времени 6-120 ч, при этом уровень экспрессии гена был нормализован до экспрессии бета-тубулина (POTUBU) конститутивного гена и экспрессирован без применения препарата в соответствии с указанной методикой [12];

фиг. 3D - уровень грибкового загрязнения в идентичных образцах, как и в панели С, измеренный методом количественного ПЦР с праймерами для общей амплификации для амплификации грибка;

фиг. 3Е - корреляционный график, обеспечивающий мониторинг корреляции в пределах от уровня экспрессии гена для целлюлозы (POCELL) до уровня грибкового загрязнения.

Фиг. 4А-4D - тест на эффективность зубных паст в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4 с точки зрения их способности удалять биопленки, искусственно созданные на керамических пластинках с гидроксилapatитовым покрытием, с использованием слюны здоровых лиц (в верхней части чертежа) и с использованием слюны лиц, пораженных заболеванием тканей пародонта (в нижней части чертежа).

На чертежах, в частности, проиллюстрировано следующее:

фиг. 4А - снимок шестиугольной плашки с использованием слюны здоровых лиц после отделения промытых биопленок в растворе и удаления керамических пластинок с гидроксилapatитовым покрытием, которые предварительно были очищены зубной щеткой без применения зубной пасты, с применением зубной пасты Odol, зубной пасты Enzycal и зубной пасты, содержащей глицерин, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4 без добавления микроорганизма *Pythium oligandrum*, зубной пасты, содержащей глицерин, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4 без добавления оксида кремния и зубной пасты, содержащей глицерин, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4;

фиг. 4В - количественная оценка содержания биопленки путем измерения интенсивности окрашивания в отдельных лунках на фиг. 1А на планшетном спектрофотометре при длине волны 562 нм;

фиг. 4С - снимок шестиугольной плашки с использованием слюны лиц, пораженных заболеванием тканей пародонта, после отделения промытых биопленок в растворе и удаления керамических пластинок с гидроксилapatитовым покрытием, которые предварительно были очищены зубной щеткой без применения зубной пасты, с применением зубной пасты Odol, зубной пасты Enzycal и зубной пасты, содержащей глицерин, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4 без добавления микроорганизма *Pythium oligandrum*, зубной пасты, содержащей глицерин, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4 без добавления оксида кремния и зубной пасты, содержащей глицерин, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4;

фиг. 4D - количественная оценка содержания биопленки путем измерения интенсивности окрашивания в отдельных лунках на фиг. 1С на планшетном спектрофотометре при длине волны 562 нм.

Иллюстративные примеры осуществления изобретения

Жидкий биологический противогрибковый препарат содержит микроорганизм *Pythium oligandrum*, и во всех иллюстративных примерах осуществления настоящего изобретения микроорганизм *Pythium oligandrum* является штаммом ATTC 38472 *Pythium oligandrum* Dreschler, депонированным в Чешской коллекции микроорганизмов (ССМ) в Масариковом университете в Брно, под наименованием *Pythium oligandrum* M1, и именно под этим наименованием он представлен ниже в иллюстративных примерах осуществления настоящего изобретения.

Ниже приведен Протокол последовательности указанного микроорганизма в соответствии с ST25_PCT:

```

<160>      2
<210>      1
<211>      759
<212>      DNA
<213>      Pythium oligandrum strain M1
<221>      ITS rRNA gene
<400>      1

atcattacca cacctaaaaa cttccaagct gaaccgttat aactatgttc tgtgcttcgt 60
cgcaagactt gaggctgaac gaaggtagct ctgcgtctat ttggatgcg gatttgctga 120
tgttatttta aacacctatt acttaatact gaactatact cgaatacga aagtttttgg 180
tttaacaat taacaacttt cagcagtgga tgcctaggct cgcacatcga tgaagaacgc 240
tgcaactgc gatacgtaat gcgaattgca gaattcagtg agtcacgaa atttgaacg 300
catattgcac ttccgggta tgccggaag tatgcctgta tcagtgccg tacatcaaac 360
ttgcctttct ttttttgtt agtcaaaatt agagatggca gaattgagg tgcctcgcg 420
tgtcttttta aagatggctc gaggcccttt aaatgtacgt tgcattcttc ttgtgtctgc 480
gaattgcgat gctatgctct ttgtgatcgg tttagattgc ttgcgctgg tggcgactt 540
cggtaggac atatggaagc aacctcaatt ggcggtatgt tcggctttgc ctgacgttaa 600
gctaagcgag ttagtatttc tgcctttcc ttgaggtgta cctgctgtgt gtgaggttga 660
ttaggctat atggttgctt gggtgtgtgg tttagcgttt tcagacgcct gcttcggtag 720
gtaaaggaga caaccaaat ttgggactga gaggttact 759

<210>      2
<211>      683
<212>      DNA
<213>      Pythium oligandrum strain M1
<221>      Mitochondrial COXII cytochrome oxidase
<400>      2

atggaaggta ttattaact tcatcatgat ttagtatttt tttaattat tlgactggt 60
ttgtttgtt ggttattatt tagagtaatc gtattattcg atgaaaaaaa aaaccaata 120
cctgctacat ttgtacatgg agcaactatt gaaattattt ggacaacaat tcagcatta 180
attttattaa ccgtagcagt tccatctttt gctttattat attcaatgga tgaattatt 240
gatccaatta taacttaaa agtaalaggt agtcaatggt actggagtta tgaattatt 300
gataatttag aatttgaga tgaaccttta attttgata gttacatggt tcaagataat 360
gacttagaaa taggacaatt taggtatta gaagtagaca accgtgtgtt tgtaccaact 420
aatagccata ttagagtttt aataacagct tctgacgttt tacattcatg ggctataccc 480
tcttaggtt taaaattaga tgcctgtcca ggtcgtttaa atcaaaactc aatgtttatt 540
aaaagagaag gtgtatttta cggtaaatgt agtgaatat gtgtataaaa tcatggtttt 600
atgccaatag ttgtgaagc agtttcatta gaagattatt tagtttggtt aaaaaacaaa 660
ttaatttga ttttaatga taa 683

```

Пример 1. Жидкий биологический противогрибковый препарат, предназначенный для опрыскивания сельскохозяйственных культур с высоким процентом по весу биомассы.

Процесс приготовления.

Биомассу, полученную путем культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 на твердо-фазном субстрате, перемешивали в емкости гомогенизатора (промышленный смеситель) с деминерализованной водой и гомогенизировали. Процесс гомогенизации проводили со скоростью 3000-5000 об/мин в течение 3 мин. Далее осмолит (сахарозу) добавляли к исходной неразбавленной суспензии в количестве, соответствующем конечной концентрации по весу, составившей 60 вес.%, и требуемому количеству ооспор. Далее суспензию с осмолитом (сахарозой) гомогенизировали в смесителе в течение 1 мин со скоростью 2000 об/мин. Далее суспензию хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C.

Было более предпочтительным приготовить жидкий биологический противогрибковый препарат путем объединения этапов гомогенизации в деминерализованной воде и последующего добавления осмолита (сахарозы) в один этап таким образом, чтобы биомассу, полученную путем культивирования на твердом субстрате, гомогенизировали в емкости промышленного гомогенизатора в растворе осмолита (65% раствор сахарозы). Процесс гомогенизации проводили со скоростью 3000-5000 об/мин в течение 3 мин. После определения количества ооспор в исходной суспензии указанную суспензию разбавляли осмолитом (65% раствор сахарозы) обычным способом таким образом, чтобы в препарате была достигнута требуемая концентрация ооспор. Далее суспензию хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C.

Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной рабо-

той Etхеberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция препарата.

Сахароза в качестве стабилизатора 60 вес.%.
 Вода в качестве стабилизатора 30 вес.%.
 Культивированная биомасса 10 вес.%.
 Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* 5×10^5 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 2. Жидкий биологический противогрибковый препарат, предназначенный для опрыскивания сельскохозяйственных культур с низким процентом по весу биомассы.

Процесс приготовления.

Биомассу *Pythium oligandrum*, полученную путем культивирования в жидкой фазе, перемешивали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя) с осмолитом (сахарозой) и гомогенизировали таким образом, чтобы были достигнуты требуемое количество ооспор и концентрация осмолита (сахарозы). Процесс гомогенизации проводили со скоростью 3000-5000 об/мин в течение 3 мин. Далее суспензию хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etхеberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Сахароза в качестве стабилизатора 64 вес.%.
 Вода в качестве стабилизатора 35,9 вес.%.
 Культивированная биомасса 0,1 вес.%.
 Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 5×10^5 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 3. Жидкий биологический противогрибковый препарат, предназначенный для протравливания зерна методом погружения/дражирования семян.

Процесс получения.

Биомассу, полученную путем культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 на твердофазном субстрате, перемешивали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя) с деминерализованной водой и гомогенизировали. Процесс гомогенизации проводили со скоростью 3000-5000 об/мин в течение 3 мин. Далее, осмолит (сахарозу) добавляли к исходной неразбавленной суспензии в количестве, соответствующем конечной концентрации по весу, составившей 60 вес.%, и требуемому количеству ооспор. Суспензию с осмолитом (сахарозой) далее гомогенизировали в смесителе в течение 1 мин.

Было более предпочтительным приготовить препарат путем объединения этапов гомогенизации в деминерализованной воде и последующего добавления осмолита (сахарозы) в один этап таким образом, чтобы биомассу, полученную путем культивирования на твердом субстрате, гомогенизировали в емкости промышленного гомогенизатора в растворе осмолита (65% раствор сахарозы). Процесс гомогенизации проводили со скоростью 3000-5000 об/мин в течение 3 мин. После определения количества ооспор в исходной суспензии указанную суспензию разбавляли осмолитом (65% раствор сахарозы) обычным способом таким образом, чтобы в препарате была достигнута требуемая концентрация ооспор. Далее полученную суспензию хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C.

Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etхеberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Композиция.

Сахароза в качестве стабилизатора 60 вес.%.
 Вода в качестве стабилизатора 36 вес.%.
 Культивированная биомасса 4 вес.%.
 Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 $2,5 \times 10^6$ на 1 мл.

Свойства.

Пример 4. Жидкий биологический противогрибковый препарат в виде концентрата суспензии с низким содержанием воды.

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную культивированием в жидкой фазе, центрифугирова-

ли после сбора. Надосадочную жидкость удаляли после центрифугирования и к центрифугированному материалу добавляли парафиновое масло таким образом, чтобы конечное количество ооспор составило 500000 ооспор на 1 мл препарата. Смесь далее гомогенизировали в промышленном смесителе в течение 3 мин. Суспензию хранили в стерильных емкостях при температуре ниже 8°C. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Культивированная биомасса 0,1 вес.%.

Парафиновое масло в качестве стабилизатора 99,9 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 5×10^5 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 5. Жидкий биологический противогрибковый препарат, применяемый в виде нановолокон, образующих биоразлагаемую матрицу прологированного действия для микроорганизма *Pythium oligandrum* M1.

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum*, полученную культивированием в жидкой фазе, центрифугировали после сбора. Надосадочную жидкость удаляли и к центрифугированному материалу добавляли осмолит (65% сахарозу) и биополимер, далее материал обрабатывали, применяя технологию электростатического вращения с использованием нетоксичного биоразлагаемого полимерного поливинилового спирта (ПВС). Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

1. Основной ингредиент (жидкая суспензия микроорганизма *Pythium oligandrum*) 84 вес.%;
содержащая:

сахарозу в качестве стабилизатора 63 вес.%,

воду в качестве стабилизатора 36 вес.%,

культивированную биомассу 1 вес.%.

2. Носитель ПВС.

ПВС в качестве разлагаемого носителя 16 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 5×10^6 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 6. Жидкий биологический противогрибковый препарат, применяемый в форме пропиточного покрытия или спрея.

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную культивированием в жидкой фазе, гомогенизировали после сбора и фильтровали с использованием способов фильтрации для отделения частиц размером до 300 мкм. После центрифугирования указанную полученную биомассу перемешивали с минеральным маслом низкой вязкости таким образом, чтобы было достигнуто требуемое количество ооспор на 1 мл препарата. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Культивированная биомасса 0,1 вес.%.

Минеральное масло в качестве стабилизатора 99,9 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 2×10^5 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре 10-45°C (в зависимости от типа вторичного вещества).

Пример 7. Жидкий биологический противогрибковый препарат, применяемый в качестве санитарно-гигиенического изделия для кондиционирования воздуха.

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную культивированием в жидкой фазе, гомогенизировали

после сбора и фильтровали с использованием способов фильтрации для отделения частиц размером до 100 мкм. После центрифугирования биомассу разбавляли солевым раствором до требуемого количества ооспор на 1 мл препарата. Принцип применения заключается в ополаскивании или опрыскивании фильтров или трубопроводов установок для кондиционирования или охлаждения воздуха. Наличие микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 гарантирует стойкость к плесени или грибковым заболеваниям. Очистка антиаллергенных фильтров:

Фильтр погружали в санитарно-гигиенический раствор и выдерживали его в нем в течение 10-30 мин и затем ополаскивали. В альтернативном варианте тот же самый раствор распыляют в виде аэрозоля на фильтр в его рабочем положении. Грязь и остатки агента сдувают сжатым воздухом.

Санитарно-профилактическая обработка аэрозольных аппаратов и фильтров.

После очистки аэрозольных аппаратов и/или фильтров раствор препарата применяют без ополаскивания. Превосходный санитарно-профилактический эффект достигается даже в том случае, когда препарат используют только в качестве смывающего и обеззараживающего средства. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Культивированная биомасса 0,1 вес.%.

Солевой раствор в качестве стабилизатора 99,9 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 5×10^5 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре 10-45°C (в зависимости от типа вторичного вещества).

Пример 8. Жидкий биологический противогрибковый препарат, применяемый в качестве санитарно-гигиенического изделия для обработки осадков - на участках илистых отложений и затопляемых территориях

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную культивированием в жидкой фазе, гомогенизировали после сбора и фильтровали с использованием способов фильтрации для отделения частиц размером до 400 мкм. После центрифугирования биомассу разбавляли дистиллированной или деминерализованной водой до требуемого количества ооспор на 1 мл препарата. Принцип действия заключается в создании водной суспензии в соответствии со степенью разбавления, указанной ниже, и в применении суспензии в районах, пострадавших от загрязненных отложений ила и осадков, в качестве консолидирующей и оздоровительной процедуры с целью улучшения свойств почв и грунтов. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Культивированная биомасса 0,1 вес.%.

Дистиллированная вода в качестве стабилизатора 99,9 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 5×10^5 на 1 мл.

Количество применяемого средства составляет от 250 г на 1 га при концентрации 500000 ооспор на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 9. Жидкий биологический противогрибковый препарат в виде стабилизированной водной суспензии ооспор *Pythium oligandrum* M1.

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную путем культивирования в жидкой фазе, смешивали со стерильной дистиллированной водой и гомогенизировали после центрифугирования (4000 об/мин, в течение 5 мин) и удаления надосадочной жидкости. Гомогенизацию продолжили при высокой скорости вращения (20000 об/мин) в течение 1 мин. Далее при необходимости суспензию можно профильтровать и сконцентрировать с целью получения концентрата суспензии, содержащего необходимое количество ооспор *Pythium oligandrum* M1 в 1 мл, без присутствия остатков исходной среды или остатков мицелия. Полученный материал суспензии можно хранить в стерильных емкостях при температуре в пределах от 1 до 8°C. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной

работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Стерильная дистиллированная вода в качестве стабилизатора 99,9 вес.%.

Культивированная биомасса 0,1 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 5×10^5 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: минимум 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 10. Жидкий биологический противогрибковый препарат в виде стабилизированной водной суспензии с высокой концентрацией ооспор *Pythium oligandrum* M1.

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную путем культивирования в жидкой фазе, гомогенизировали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя). Процесс гомогенизации проводили со скоростью 20000 об/мин в течение 3 мин. Суспензию затем центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости биомассу концентрировали до требуемого количества ооспор в 1 мл препарата путем перемешивания с осмолитом (65% сахарозой). Концентрат суспензии хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Сахароза в качестве стабилизатора 60 вес.%.

Вода в качестве стабилизатора 35 вес.%.

Культивированная биомасса 5 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 2×10^7 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 11. Биологический противогрибковый препарат в форме пасты на основе глицерина.

Процесс получения.

1197,1 г глицерина фармацевтического качества (глицерин 99% PharmEur) заливали в лабораторный гомогенизатор и осторожно вбрызгивали 239,4 г оксида кремния Sident® 22 S, 43,1 г культивированной биомассы, 14,4 г витамина Е и 6 г шалфейного ароматизатора. Смесь перемешивали со скоростью 60 об/мин в течение 10 мин при лабораторной температуре. Смесь далее помещали в пластиковые трубки с пробками по 75 г в каждую, таким образом, в общей сложности было заполнено 20 таких трубок. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Глицерин 99% Pharm Eur в качестве стабилизатора 79,77 вес.%.

SiO₂ Sident® 22 S в качестве наполнителя на основе оксида кремния 16,00 вес.%.

Культивированная биомасса *Pythium oligandrum* M1 2,87 вес.%.

Ацетат (витамин Е) в качестве вспомогательного вещества 0,96 вес.%.

FCO2 Bio 35% шалфейный ароматизатор 0,40 вес.%.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 $2,5 \times 10^4$ на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: минимум 6 месяцев при температуре 25°C.

Пример 12. Биологический противогрибковый препарат в форме пасты на основе оливкового масла.

Процесс получения.

600 г оливкового масла первого отжима заливали в лабораторный гомогенизатор и осторожно вбрызгивали 120 г оксида кремния Sident® 22 S, 21,6 г культивированной биомассы, 7,2 г витамина Е и 3 г мятного ароматизатора. Смесь перемешивали со скоростью 20 об/мин в течение 10 мин при лабораторной температуре. Смесь далее помещали в пластиковые трубки с пробками, по 75 г в каждую, таким образом, в общей сложности было заполнено 10 таких трубок. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Рафинированное оливковое масло в качестве стабилизатора 79,77 вес. %.

SiO₂ Sident® 22 S в качестве наполнителя на основе оксида кремния 16,00 вес. %.

Культивированная биомасса *Pythium oligandrum* M1 2,87 вес. %.

Ацетат (витамин E) в качестве вспомогательного вещества 0,96 вес. %.

HNA мятное эфирное масло в качестве ароматизатора 0,40 вес. %.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 $2,5 \times 10^4$ на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре 25°C.

Пример 13. Жидкий биологический противогрибковый препарат для защиты водных организмов.

Препарат предназначен для профилактической защиты рыб и молоди рыб (карп, плотва, лещ) от ряда грибковых заболеваний (в частности, *Aspergillus* spp.). Препарат применяют профилактически в нерестовых аквариумах. Препарат также предназначен для профилактической защиты молоди рыб от воздействия ряда грибковых заболеваний (в частности, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp.).

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную путем культивирования в жидкой фазе, гомогенизировали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя). Процесс гомогенизации проводили со скоростью 20000 об/мин в течение 3 мин. Суспензию затем центрифугировали и после удаления надосадочной жидкости биомассу концентрировали до требуемого количества ооспор в 1 мл препарата путем перемешивания с осмолитом (65% сахарозой). Суспензию хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Сахароза в качестве стабилизатора 63 вес. %.

Вода в качестве стабилизатора 36 вес. %.

Культивированная биомасса 1 вес. %.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 5×10^6 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 14. Жидкий биологический противогрибковый препарат для обработки пчелиных сот.

Препарат предназначен для профилактической обработки пчелиных сот с целью предотвращения воздействия широкого ряда грибов, в частности, семейств *Aspergillus* и *Fusarium*. Препарат может быть использован для обработки сот, предназначенных для хранения вне пчелиных ульев, и сот внутри пчелиных ульев, не занятых пчелами.

Процесс получения.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную путем культивирования в жидкой фазе, перемешивали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя) с осмолитом (сахарозой) и гомогенизировали таким образом, чтобы были достигнуты требуемое количество ооспор и концентрация осмолита (сахарозы). Процесс гомогенизации проводили со скоростью 20000 об/мин в течение 3 мин. Далее суспензию хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C. Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Композиция.

Сахароза в качестве стабилизатора 64 вес. %.

Вода в качестве стабилизатора 35,9 вес. %.

Культивированная биомасса 0,1 вес. %.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 1×10^6 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 15. Жидкий биологический противогрибковый препарат в виде концентрата ангидридной суспензии, предназначенный для опрыскивания сельскохозяйственных культур.

Биомассу, полученную путем культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 на твердофазном субстрате, перемешивали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя) с деминерализованной водой и гомогенизировали. Процесс гомогенизации проводили со скоростью 3000-5000 об/мин в течение 3 мин. После завершения процесса гомогенизации полученную суспензию перемешивали с

неорганическим носителем (Sipernat), высушивали и измельчали в центробежной мельнице для получения конечного размера частиц не более 350 мкм. Далее сухую культивированную биомассу с носителем перемешивали с парафиновым маслом с целью достижения требуемой концентрации ооспор в препарате. Суспензию хранили в стерильных емкостях при температуре не выше 25°C.

Преимущество указанного препарата по сравнению с примером 1 заключается в более длительной стабильности препарата, обусловленной наличием воды. Неорганический носитель на основе оксида кремния обеспечивает хорошую суспензированность твердых частиц (биомасса) в препарате.

Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность была определена путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г.

Композиция.

Культивированная биомасса 1,5 вес. %.

Sipernat 22 в качестве неорганического носителя 6,5 вес. %.

Парафиновое масло в качестве стабилизатора 92 вес. %.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 1×10^6 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 24 месяца при температуре не выше 25°C.

Пример 16. Жидкий биологический противогрибковый препарат в виде концентрата ангидридной суспензии, предназначенный для опрыскивания сельскохозяйственных культур при производстве экологически чистой сельскохозяйственной продукции.

Биомассу, полученную путем культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 на твердофазном субстрате, перемешивали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя) с деминерализованной водой и гомогенизировали. Процесс гомогенизации проводили со скоростью 3000-5000 об/мин в течение 3 мин. После завершения процесса гомогенизации полученную суспензию перемешивали с неорганическим носителем (Sipernat), высушивали и измельчали в центробежной мельнице для получения конечного размера частиц не более 350 мкм. Далее сухую культивированную биомассу с носителем перемешивали с подсолнечным маслом с целью достижения требуемой концентрации ооспор в препарате. Суспензию хранили в стерильных емкостях при температуре не выше 25°C.

Преимущество указанного препарата по сравнению с примером 1 заключается в более длительной стабильности препарата, обусловленной наличием воды. Неорганический носитель на основе оксида кремния обеспечивает хорошую суспензированность твердых частиц (биомасса) в препарате.

Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность была определена путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г.

Композиция.

Культивированная биомасса 1,5 вес. %.

Sipernat 22 в качестве неорганического носителя 6,5 вес. %.

Подсолнечное масло в качестве стабилизатора 92 вес. %.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 1×10^6 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 24 месяца при температуре не выше 25°C.

Пример 17. Жидкий биологический противогрибковый препарат с пониженной концентрацией ооспор.

Биомассу *Pythium oligandrum* M1, полученную путем культивирования в жидкой фазе, перемешивали в емкости гомогенизатора (промышленного смесителя) с осмолитом (сахарозой) и гомогенизировали таким образом, чтобы были достигнуты требуемое количество ооспор и концентрация осмолита (сахарозы). Процесс гомогенизации проводили со скоростью 20000 об/мин в течение 3 мин. Суспензию далее перемешивали с осмолитом (65% сахарозой) таким образом, чтобы концентрация ооспор в препарате соответствовала требованиям, предъявляемым к препарату. Далее суспензию хранили в стерильных емкостях из нержавеющей стали при температуре ниже 8°C.

Количество dormantных ооспор было определено при помощи микроскопа с использованием счетной камеры Sedgewick-Rafter, и стабильность измеряли путем исследования под микроскопом количества жизнеспособных ооспор, используя плазмолитический метод, в соответствии с опубликованной работой Etcheberria et al. [13], 2011 г. Количество dormantных ооспор при необходимости стабилизировали обычным способом.

Композиция.

Сахароза в качестве стабилизатора 64,95 вес. %.

Вода в качестве стабилизатора 35 вес. %.

Культивированная биомасса 0,05 вес. %.

Количество dormantных ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 1×10^3 на 1 мл.

Свойства.

Стабильность: 12 месяцев при температуре в пределах от 2 до 8°C; 6 месяцев при температуре ниже 25°C.

Пример 18. Лабораторный тест на эффективность жидких биологических противогрибковых препаратов в микопаразитических экспериментах.

Лабораторные испытания пролиферации *Pythium oligandrum* M1 из dormantных ооспор концентрата суспензии в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 и последующего микопаразитизма на фитопатогенном грибе *Fusarium graminearum* были проведены на стерильных агаровых пластинках с живой средой на основе солодового экстракта. Разбавленный концентрат наносили на агаровую пластинку на уровне применения, а именно 0,2 мл концентрата на 1 л воды, и часть указанной пластинки удаляли после прорастания и переносили на другой агар, который одновременно инокулировали грибом *Fusarium graminearum*.

Результат данного теста приведен на фиг. 1, который указывает на резкое прекращение роста фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* после добавления микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 при сравнении с обычными темпами роста (фиг. 1A). Данная ситуация дополнительно проиллюстрирована с использованием ряда чашек Петри, сфотографированных через 4 дня, при этом на снимках виден совместный рост как микроорганизмов, с одной стороны, так и рост фитопатогенных грибов, с другой стороны (фиг. 1B). После 11 дней культивирования наблюдается явное существенное подавление фитопатогенных грибов при одновременном росте микроорганизма *Pythium oligandrum* M1. Если количество жизнеспособных ооспор не снижалось менее 90% от исходного значения, препарат маркировали как стабильный.

Пример 19. Эффективность воздействия противогрибковых средств на фитопатогенные грибы, продемонстрированная в ходе проведения лабораторных экспериментов с пшеницей.

Зерна злаковой культуры (пшеницы) обрабатывали раствором Sava -коммерческое название раствора хлористокислого натрия (1-5% раствор) и проращивали на экстракте агаризованной почвы. После проращивания ростки снова обрабатывали 1% раствором Sava и помещали на слой фитоагара в 250 мл коническую колбу Эрленмейера. Колбы инокулировали кусочком агара (5 мм) с фитопатогеном *Fusarium graminearum* или с микроорганизмом *Pythium oligandrum* M1 (dormantные ооспоры в концентрате суспензии) применимых концентрации 0,2 мл на 1 л и объема 0,2 мл в следующих версиях: 1) фитопатоген; 2) фитопатоген + *Pythium oligandrum* M1; 3) только один *Pythium oligandrum* M1; контрольный образец, который не был инокулирован. Колбы закрывали тонким слоем целлюлозы и марлей. Культивирование проводили в помещении при температуре 24°C. Проводился мониторинг роста колонии фитопатогенов и микроорганизма *Pythium oligandrum* M1, а также состояния растения.

Результаты данного лабораторного эксперимента приведены на фиг. 2. Что касается добавления фактического фитопатогена, его существенный рост в окружении растущей пшеницы безусловно очевиден, также как и повреждение растений, вызванное патогеном (фиг. 2A). При добавлении микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 дополнительно к фитопатогенному грибу наличие фитопатогена не наблюдалось, и при этом происходил эффективный рост выращиваемых растений (фиг. 2B). Контрольный эксперимент, проведенный при наличии только одного микроорганизма *Pythium oligandrum* M1, продемонстрировал нормальный рост пшеницы, сравнимый с ростом в экспериментах без добавления какого-либо микроорганизма (фиг. 2C).

Пример 20. Тест на эффективность жидкого биологического противогрибкового препарата, предназначенного для опрыскивания сельскохозяйственных культур, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 2 при проведении опыта на семенах рапса *Brassica napus* в вегетационном домике.

Было использовано четыре сектора в вегетационном домике компании в Угерсе, в которых выращивали рапс *Brassica napus*, сорт Lohana C1, при этом препарат начали применять при фазе роста и развития зерновых культур BVCh 15-21. В секторе 1 был применен порошковый биофунгицид, содержащий микопаразитический микроорганизм *Pythium oligandrum* M1 (Polyversum®), в секторе 2 был применен новый жидкий фунгицид в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 настоящего изобретения, в секторе 3 был применен новый жидкий противогрибковый препарат в соответствии с иллюстративным примером осуществления 2 настоящего изобретения, и в секторе 4 был применен новый жидкий противогрибковый препарат в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4 настоящего изобретения. При применении концентрация препарата во всех случаях составляла 0,5 г на 1 л, или 0,5 мл на 1 л, при этом на 1 м² обрабатываемого участка распыляли такой концентрированный препарат в количестве 100 мл. В каждом секторе был отмечен пункт для отбора образцов, охватывающий растение и почву между рядами. Во время каждого отбора образцов проводилось фотографическое документирование и регистрация температуры в вегетационном домике. Отобранные образцы переносили в лабораторию в течение одного часа и хранили их в морозильнике при -20°C до момента проведения анализа. Образцы отбирали до применения противогрибковых препаратов и затем через 1 ч, 2 ч, 7 ч, 20 ч, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 11 дней, 14 дней, 17 дней и 20 дней после применения.

Лабораторная обработка образцов включала фотографическое документирование отдельных растений, отделение листа и корня, определение веса сырого вещества образца, гомогенизацию образца в буфере для выделения ДНК, центрифугирование и проведение молекулярного анализа. Количественное определение наличия микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 проводили с использованием метода количественной ПЦР с зондом, направленным на последовательность внутреннего транскрибируемого участка-спейсера (ITS), при этом количественное определение ДНК рапса проводили с использованием аналогичного метода с зондом, направленным на последовательность *Fat(A)A*. Количественное определение предусматривало выполнение 50 циклов амплификации ДНК при стандартных условиях и расчет концентрации последовательностей-мишеней с использованием калибровочной кривой. Уровень микоза был определен аналогичным образом на основе стандартного протокола.

Результаты теста на эффективность приведены в табл. 1 ниже. Эффективность, достигнутая с помощью новых жидких противогрибковых препаратов в соответствии с настоящим изобретением, во всех случаях сравнима с эффективностью твердого порошкового препарата или выше эффективности указанного препарата. Во всех случаях чужеродные грибки подавлялись в зависимости от колонизации и амплификации микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 на участке применения препарата. Низкий уровень загрязнения грибами далее сохранялся даже после уменьшения концентрации микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 в конце эксперимента. В указанном эксперименте контроль за динамикой популяции микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 проводили только в течение 15 дней, что выразилось в отсутствии каких-либо комментариев по поводу долгосрочного эффекта. Тем не менее, с точки зрения противогрибковой эффективности препарата отсутствуют какие-либо сомнения в том, что способность подавления грибов является существенной и долговременной: наблюдалось уменьшение возникновения таких грибов приблизительно на один порядок спустя 24 ч после применения препарата и дальнейшее уменьшение почти на один порядок спустя еще 24 ч.

Таблица 1

Определение содержания микроорганизма <i>Pythium oligandrum</i> M1 и определение содержания гриба на листьях рапса при проведении эксперимента в вегетационном домике. Результаты приведены в виде численных значений обнаруженных диплоидных геномов на 1 г хозяйской ДНК рапса.								
Время сбора (ч)	Сектор 1		Сектор 2		Сектор 3		Сектор 4	
	<i>Pythium</i>	Грибы	<i>Pythium</i>	Грибы	<i>Pythium</i>	Грибы	<i>Pythium</i>	Грибы
0	8×10^2	1×10^5	7×10^2	1×10^5	8×10^2	2×10^5	6×10^2	2×10^5
2	2×10^4	8×10^5	1×10^4	1×10^5	1×10^4	1×10^5	2×10^4	1×10^5
20	2×10^5	1×10^5	2×10^5	2×10^5	2×10^5	3×10^5	2×10^5	2×10^5
26	5×10^5	6×10^4	6×10^5	6×10^4	7×10^4	5×10^4	6×10^5	5×10^4
44	1×10^6	2×10^4	2×10^6	2×10^4	1×10^6	2×10^4	2×10^6	1×10^4
92	8×10^5	1×10^3	8×10^5	2×10^3	7×10^5	1×10^3	7×10^5	3×10^3
140	1×10^4	5×10^2	3×10^4	6×10^2	4×10^4	6×10^2	4×10^4	5×10^2
212	1×10^4	5×10^2	2×10^4	5×10^2	2×10^4	7×10^2	2×10^4	6×10^2
356	8×10^3	6×10^2	1×10^4	4×10^2	1×10^4	5×10^2	1×10^4	4×10^2

Пример 21. Тест на эффективность жидкого биологического противогрибкового препарата, предназначенного для опрыскивания сельскохозяйственных культур, в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 при проведении полевых испытаний пшеницы *Triticum aestivum*.

Озимую пшеницу *Triticum aestivum* высевали в октябре 2015 г. на поле, принадлежащем компании вблизи деревни Úherce u Loun. Противогрибковый препарат в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 настоящего изобретения наносили на специально выделенные борозды в ноябре 2015 г., используя стандартный способ распыления в количестве 100 мл на 1 га в соответствии с сельскохозяйственными стандартами и с принятой регистрацией противогрибкового препарата для защиты растений Polyversum®. Образцы были взяты с 4-х намеченных пунктов отбора до применения препарата и через различное количество дней после применения препарата, при этом были отобраны образцы прорастающих ростков пшеницы и почвы в непосредственной близости от образца. Образцы замораживали непосредственно после отбора и хранили в герметичных пакетах или тестовых пробирках при -20°C до начала проведения анализа. Из отобранных образцов экстрагировали нуклеиновые кислоты с использованием опубликованного способа (Klimeš R., Suchánek M., Mašalková L. et al. /2016/ Comparison of the efficacy of treatment of dermatophytosis by chemical and biological antifungals: soil peronosporomycete *Pythium oligandrum* is as efficient as the antifungal enilconazole in the guinea pig model, Vet Dermatol, in print) и использовали для молекулярного анализа.

Что касается динамики возникновения микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 после распыления с использованием жидкого препарата в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 настоящего изобретения, стандартизированные концентрации на растениях и окружающей почве продемонстрировали аналогичную зависимость. Поскольку только отдельные клетки на один грамм образца могли быть идентифицированы с помощью генетического теста количественной ПЦР до применения препарата, это количество возросло до сотен клеток на один грамм образца после применения жидкого препарата, что соответствует стандартному нормализованному количеству. Наблюдалась видимая мультипликация микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 в экспериментальных условиях на участке спустя

48 ч, при этом такая положительная тенденция была прервана в условиях специального эксперимента при наступлении мороза в начале декабря 2015 г., после чего динамический рост популяции не был восстановлен (сравните фиг. 3А и 3В).

Полезная информация была получена при проведении анализа профилей экспрессии гена с использованием метода обратной транскрипции-количественной ПЦР (RT-qPCR) во время "пиковой" фазы эксперимента при наибольшем росте микроорганизма *Pythium oligandrum* M1. Значения концентрации транскриптов продемонстрировали быструю реакцию на возникающие патогенные грибы в первой фазе (существенная экспрессия гена для целлюлозы), после чего последовало повышенное образование зооспор (экспрессия эндоглюканазы). Только спустя 48 и 120 ч появляется характерный маркерный ген повышенной споруляции, в первую очередь, в окружающей почве и корнях (фиг. 3С). При этом существовала возможность наблюдать существенное уменьшение относительного содержания грибка спустя 48 ч после применения препарата (фиг. 3D), и такое уменьшение взаимно обратно соответствовало экспрессии гена для целлюлозы, обуславливающей распад поверхностных сахаридов в грибах во время микопаразитического действия микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 (фиг. 3Е).

Пример 22. Проверка зубных паст на эффективность с использованием модели биопленки ротовой полости с механическим удалением зубного налета.

Были проведены лабораторные испытания с использованием модели биопленки ротовой полости с механическим удалением зубного налета в соответствии с опубликованной работой Verkaik M.J. et al. [14] 2010 г. с целью мониторинга эффективности приготовленных зубных паст. Была использована версия (В) выше опубликованного протокола, состоящая из 2-часовой адгезии с последующим ростом в течение ночи (16-часовая биопленка) и механической очистки. Эффективность глицериновой зубной пасты, содержащей микроорганизм *Pythium oligandrum* M1, и зубных паст с оливковым маслом и микроорганизмом *Pythium oligandrum* M1 при удалении микроорганизмов зубного налета сравнивали с двумя типами наиболее распространенных зубных паст (Odol и Enzycal), и в качестве контроля использовали механическую очистку зубной щеткой без какой-либо зубной пасты (маркированной "Контроль"). Аналогичную зубную пасту, не содержащую *Pythium oligandrum* и оксида кремния в качестве абразива, использовали в контрольном эксперименте.

Результаты указанного теста приведены в таблице на фиг. 2. Исходя из результатов теста было обнаружено, что зубная паста в соответствии с иллюстративным примером осуществления 4 обладала значительно более высокой эффективностью при удалении дентальной биопленки и налета по сравнению с используемым альтернативным препаратом даже среди лиц, пораженных заболеванием тканей пародонта (фиг. 4А-4D). В то время как широко используемые до настоящего времени зубные пасты обеспечили почти вдвое уменьшение интенсивности формирования биопленки, новые зубные пасты в соответствии с настоящим изобретением обеспечили уменьшение до одной десятой. Эффект при использовании контрольной зубной пасты, не содержащей микроорганизм *Pythium oligandrum* M1, сравним с обычными зубными пастами, в то время как эффект был значительно выше при использовании контрольной зубной пасты без оксида кремния. Общий уровень формирования биопленки у пациента, страдающего от заболевания тканей пародонта, был существенно выше, а также наблюдалось значительное различие эффективности отдельных зубных паст.

Пример 23. Тест на эффективность жидкого биологического противогрибкового препарата в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 при защите жилых помещений от грибковых спор.

Противогрибковый препарат в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1 разбавляли водой до концентрации 330000 ооспор на 1 л применяемого раствора, т.е. 0,66 мл жидкого концентрата добавляли к 1 л раствора. При аналогичных условиях также приготавливали контрольный раствор, не содержащий *Pythium oligandrum* M1; биомассу заменяли водой. Таким образом, приготовленные растворы применяли в двух небольших закрытых помещениях на ферме Úherce u Loup No. 2 путем их распыления в виде мелкодисперсного аэрозоля с помощью распылительного устройства. После распыления оба помещения были плотно закрыты и был проведен тест на выпадение по определению содержания спор по методу Omeljanský. Оценка результатов была проведена в лаборатории д-ра Miroslav Kolařík в Институте микробиологии Академии Наук Чешской Республики в Праге.

Результаты эксперимента представлены ниже в табл. 2. Эксперимент проводили в закрытых помещениях без какого-либо потока воздуха, по этой причине наблюдаемые изменения происходили более медленными темпами, и их проявление наблюдалось только через несколько месяцев. Тем не менее, из результатов явно следует, что в контрольном помещении 1 с применением вспомогательных веществ определенное количество спор колебалось, однако в любой момент наблюдений не опускалось ниже установленного ВОЗ предела (Всемирная организация здравоохранения) в количестве 500 спор на 1 м³ воздуха. С другой стороны, наблюдалось статистически значимое сокращение количества спор через 3 месяца после применения раствора в помещении 2, и затем наблюдалось дальнейшее сокращение количества спор ниже установленного ВОЗ предела спустя 6 месяцев после даты применения раствора.

Таблица 2

Измерение количества грибковых спор на 1 кубический метр помещения с применением контрольного препарата и в помещении 2 с применением препарата, содержащего активный ингредиент <i>Pythium oligandrum</i> M1				
Месяцы после применения (0 – до применения)	0	1	3	6
Помещение 1, контроль	5000	4500	3500	4500
Помещение 2 (препарат в соответствии с иллюстративным примером осуществления 1)	5000	4000	1300	400

Пример 24. Способ получения жидкого биологического противогрибкового препарата, включающего *Pythium oligandrum* M1.

Характер жидкого биологического противогрибкового препарата, включающего *Pythium oligandrum* M1, в соответствии с настоящим изобретением был детально продемонстрирован в предыдущих иллюстративных примерах осуществления настоящего изобретения.

Примеры способа получения жидкого биологического противогрибкового препарата, включающего *Pythium oligandrum* M1, в соответствии с настоящим изобретением представлены ниже.

Среду, включающую экстракт зерновых злаков, тростниково-сахарную мелассу и другие необходимые питательные вещества, использовали для аэробного культивирования оомицетов *Pythium oligandrum* M1. Жидкую среду стерилизовали в паровом стерилизаторе. После охлаждения среду инокулировали одним из выбранных штаммов *Pythium oligandrum* M1. После завершения культивирования (процесс культивирования занимает приблизительно 13 дней) биомассу собирали и перерабатывали с использованием технологии, представленной выше в иллюстративных примерах осуществления настоящего изобретения.

Приготавливали среду для культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 на твердофазном субстрате, содержащем злаковые зерна, предпочтительно шелушенные зерна проса, например, *Panicum miliaceum* L, которые смешивали с определенным процентом живой жидкой среды. Среду стерилизовали в аппарате для культивирования в паровом стерилизаторе. После охлаждения среду инокулировали одним из выбранных штаммов *Pythium oligandrum* M1. После завершения процесса культивирования (процесс культивирования занимает приблизительно 8 дней) собранную биомассу далее перерабатывали в концентрат суспензии, как описывалось выше в иллюстративных примерах осуществления настоящего изобретения.

После завершения этапа культивирования *Pythium oligandrum* в жидкой фазе и в твердой фазе биомассу гомогенизировали жидкой средой, например, в промышленном смесителе таким образом, чтобы размер по меньшей мере 95% частиц в суспензии находился в пределах от 0,05 до 0,30 мм, предпочтительно в пределах от 0,050 до 0,125 мм. Таким образом, гомогенная суспензия характеризовалась определенным количеством ооспор. Суспензию нормализовали - концентрировали или разбавляли - в зависимости от количества ооспор до предварительно заданной концентрации ооспор, подходящей для получения жидкого биологического противогрибкового препарата, являющегося предметом рассмотрения.

После завершения фазы культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* M1 на твердофазном субстрате биомассу гомогенизировали предпочтительно в промышленном смесителе в соответствующем объеме деминерализованной воды таким образом, чтобы окончательный размер как минимум 95% частиц в суспензии находился в пределах от 0,050 до 0,300 мм, предпочтительно в пределах от 0,050 до 0,125 мм. Таким образом, гомогенная суспензия характеризовалась определенным количеством ооспор. Полученную суспензию концентрировали или разбавляли в зависимости от количества ооспор до предварительно заданной концентрации ооспор, подходящей для получения жидкого биологического противогрибкового препарата, являющегося предметом рассмотрения.

Суспензию отделяли, например, фильтровали после фазы гомогенизации и концентрирования или разбавления с целью обеспечения максимально допустимого размера частиц в пределах соответствующего диапазона. При достижении размера частиц приблизительно 0,05-0,125 мм существует большая вероятность получения концентрированной суспензии или практически чистой концентрированной суспензии ооспор *Pythium oligandrum* M1. В большинстве представленных выше иллюстративных примерах осуществления настоящего изобретения размер частиц преимущественно находился в пределах 0,050-0,125 мм.

Водная суспензия может быть стабилизирована в процессе гомогенизации добавкой осмолита и может храниться в стерильных емкостях большого объема при температуре ниже 8°C.

В части, касающейся ангидридной суспензии микроорганизма *Pythium oligandrum* M1, материал, полученный после завершения стадии культивирования на твердофазном субстрате или в жидкой фазе гомогенизировали, предпочтительно в промышленном смесителе таким образом, чтобы окончательный размер как минимум 95% частиц в суспензии находился в пределах от 0,050 до 0,300 мм, предпочтительно в пределах от 0,050 до 0,125 мм. Полученная гомогенная суспензия, характеризующаяся определенным количеством ооспор, далее центрифугируют и после удаления надосадочной жидкости, к подверг-

шемуся центрифугированию материалу добавляют масло для достижения предварительно заданной концентрации ооспор, при необходимости для получения жидкого биологического противогрибкового препарата, являющегося предметом рассмотрения. Полученный материал далее ресуспендировали, например, с использованием промышленного смесителя.

Специфические возможные способы получения указаны в приведенных выше иллюстративных примерах осуществления настоящего изобретения, однако они не ограничены указанными примерами.

Промышленная применимость

Новый жидкий противогрибковый препарат, включающий стабилизированную суспензию ооспор, может быть получен в больших объема главным образом ввиду того, что как ферментативный этап производства, так и стадия приготовления лекарственной формы являются легко управляемыми с технической точки зрения. Новый жидкий препарат может найти применение во всех областях, в которых нашли применение и используются до настоящего времени другие формы омицетов *Pythium oligandrum* микроскопических размеров, в частности, в области биологической защиты растений, защиты общественных и жилых зданий от грибов, подавления плесени и дрожжевых грибов и достижения физиологического баланса микрофлоры в области клинической и ветеринарной медицины. Применение препарата в качестве защитного спрея для защиты растений с использованием биоразлагаемого полимера, действующего как защитный фактор и как "носитель" биоразлагаемой матрицы пролонгированного действия микроорганизма *Pythium oligandrum*, является исключительно инновационным. Препарат в соответствии с настоящим изобретением также может быть эффективно использован для нанесения или напыления покрытия на деревянные конструкции, в то время как масляные компоненты препарата также обеспечивают эффективную пропитку древесины. Наличие микроорганизма обеспечивает устойчивость к воздействию плесени и грибковых заболеваний и предохранение древесины от повреждения. Одной из совершенно новых областей применения является эффективная консервация оборудования для очистки воздуха, установок кондиционирования воздуха и охладительных агрегатов. Также представляется предпочтительным использовать специально разработанный препарат для снижения уровня грибкового загрязнения в районах, подвергшихся затоплению, засухе, и на территориях, прилегающих к рекультивированным землям и районам мелиоративного строительства.

Список литературы

1. Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, LeFloch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P (2014) Biological control of plant pathogens: advantage and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*, Environ Sci Pollut Res 21, 4847-4860,
2. Drechsler C (1943) Several species of *Pythium* peculiar in their sexual development, Phytopathology 33, 261-299,
3. Deacon JW (1976) Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi, Trans Brit Mycol Soc 66, 383-391.
4. US 4,259,317, Veselý D, Hejdánek S, Preparation for the protection of emerging sugar beets against dumping-off, and method of its production.
5. US 4,574,083, Baker R, Lifshitz R, Isolates of *Pythium* species which are antagonistic to *Pythium ultimum*.
6. US 5,961,971, Martin FN, Biocontrol of fungal soilborne pathogens by *Pythium oligandrum*.
7. CZ 303 908 B6, BIOPREPÁRÁTY, spol. s r.o. (Suchánek M.), Use of fungal organism *Pythium oligandrum*
8. CN 10 2807 957A, Liu X. a spol, Method for increasing *Phytophthora capsici* output and promoting oospore germination.
9. US 2014/0 212 387A1, Luth P, Liquid preparation for biological plant protection, m
10. McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1990) Oospores of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* bulk-produced in liquid culture. Mycol Res 94, 613-616
11. McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1992) Effect of osmotic and matrix potential on growth and oospore germination of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. Mycol Res 96, 588-591.
12. Takenaka S, Ishikawa S (2013) Biocontrol of sugar beet seedlings and taproots diseases caused by *Aphanomyces cochlioides* by *Pythium oligandrum* treatments before transplanting. JapAgric Res Quart 47, 75-83.
13. Etxeberria A, Mendarte S, Larregla S. (2011) Determination of viability of *Phytophthora capsici* oospores with the tetrazolium bromide staining test versus a plasmolysis method. Rev Iberoam Micol. 28, 43-49,
14. Verkaik MJ a spol. (2010) Oral biofilm models for mechanical plaque removal. Clin Oral Invest 14:403-409,
15. Wright D (2004) Use of sugars in cryopreserving human oocytes. Reprod Bio Med Online 9, 179-186.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биологический жидкий противогрибковый препарат, содержащий микроорганизм *Pythium oligandrum*, отличающийся тем, что препарат содержит стабилизированную суспензию микроорганизма *Pythium oligandrum*, с долгосрочной стабильностью при температуре ниже 25°C от 6 до 24 месяцев, при этом размер по меньшей мере 95% частиц суспензии находится в пределах от 0,050 до 0,300 мм и включает 0,05-10,0 вес.% культивированной биомассы микроорганизма *Pythium oligandrum*, содержащей среду культивирования, клеточные формы указанного микроорганизма и вещества, продуцируемые указанным микроорганизмом, и 90,0-99,95 вес.% стабилизатора, который содержит масло или по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, включающей воду, солевой раствор либо растворы осмолитов, при этом *Pythium oligandrum* является штаммом *Pythium oligandrum* Dreschler ATTC38472, и предварительно заданное количество dormantных ооспор в 1 мл указанного жидкого биологического противогрибкового препарата после нормализации находится в пределах от 1×10^3 до 2×10^7 .

2. Биологический жидкий противогрибковый препарат, содержащий микроорганизм *Pythium oligandrum*, отличающийся тем, что препарат содержит стабилизированную суспензию микроорганизма *Pythium oligandrum* с долгосрочной стабильностью при температуре ниже 25°C от 6 до 24 месяцев, при этом размер по меньшей мере 95% частиц суспензии находится в пределах от 0,050 до 0,300 мм, и включает 0,05-10,0 вес.% культивированной биомассы микроорганизма *Pythium oligandrum*, содержащей среду культивирования, клеточные формы указанного микроорганизма и вещества, продуцируемые указанным микроорганизмом, 79,77-99,95 вес.% стабилизатора, который содержит масло или по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, включающей воду, солевой раствор либо растворы осмолитов, при этом остальная часть содержит до 100 вес.% по меньшей мере одно общее модифицирующее/вспомогательное вещество, выбранное из группы, включающей наполнитель, ароматизатор и витамин Е, при этом *Pythium oligandrum* является штаммом *Pythium oligandrum* Dreschler ATTC38472 и предварительно заданное количество dormantных ооспор в 1 мл указанного жидкого биологического противогрибкового препарата после нормализации находится в пределах от $2,5 \times 10^4$ до $1,0 \times 10^6$.

3. Биологический жидкий противогрибковый препарат по пп.1, 2, отличающийся тем, что размер по меньшей мере 95% частиц суспензии находится в пределах предпочтительно от 0,050 до 0,125 мм.

4. Противогрибковый препарат по п.1 или 2, отличающийся тем, что микроорганизм *Pythium oligandrum* Dreschler ATTC 38472 является штаммом, депонированным в Чешской коллекции микроорганизмов (CCM) в Масариковом университете в Брно под наименованием *Pythium oligandrum* M1.

5. Противогрибковый препарат по одному из пп.1-4, отличающийся тем, что стабилизированная суспензия микроорганизма *Pythium oligandrum* включает стабилизатор на водной основе, содержание которой находится в пределах от 30,0 до 99,9 вес.%.

6. Противогрибковый препарат по п.5, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой только дистиллированную воду или стерильную дистиллированную воду, содержание которой составляет 99,9 вес.%.

7. Противогрибковый препарат по п.5, отличающийся тем, что стабилизатор водной суспензии представляет собой солевой раствор, содержание которого составляет 99,9 вес.%.

8. Противогрибковый препарат по п.5, отличающийся тем, что стабилизатор водной суспензии содержит воду и осмолит, и, в частности, воду в количестве от 30 до 36 вес.% и осмолит в форме сахарозы, содержание которого находится в пределах от 60,0 до 64,95 вес.%.

9. Противогрибковый препарат по одному из пп.1-4, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой по меньшей мере одно из масел, выбранное из группы, включающей парафиновое масло, минеральное масло, глицерин или подсолнечное масло в количестве 79,77-99,9 вес.%.

10. Противогрибковый препарат по п.2 или 4, отличающийся тем, что препарат содержит 16,0 вес.% биоразлагаемой матрицы пролонгированного действия в качестве носителя ооспор микроорганизма *Pythium oligandrum*, такого как поливиниловый спирт.

11. Способ получения жидкого биологического противогрибкового препарата, содержащего микроорганизм *Pythium oligandrum*, включающего стабилизированную суспензию микроорганизма *Pythium oligandrum* по одному из пп.1-10, отличающийся тем, что:

а) обеспечивают жидкую среду, включающую экстракт зерновых злаков, тростниково-сахарную мелассу и другие необходимые питательные вещества для аэробного культивирования оомицетов микроорганизма *Pythium oligandrum* в жидкой фазе;

б) жидкую среду стерилизуют;

в) после охлаждения среду инокулируют штаммом микроорганизма *Pythium oligandrum*;

г) микроорганизм *Pythium oligandrum* культивируют в указанной среде;

д) биомассу собирают и перерабатывают по завершении процесса культивирования;

е) далее, после завершения фазы культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* в жидкой фазе биомассу гомогенизируют жидкой средой таким образом, чтобы окончательный размер как минимум 95% частиц в суспензии находился в пределах от 0,050 до 0,300 мм;

ж) полученную гомогенную суспензию, характеризующуюся определенным количеством ооспор, далее нормализуют в зависимости от количества ооспор до предварительно заданной концентрации ооспор для жидкого биологического противогрибкового препарата.

12. Способ получения жидкого биологического противогрибкового препарата, содержащего микроорганизм *Pythium oligandrum*, включающего стабилизированную суспензию микроорганизма *Pythium oligandrum* по одному из пп.1-10, отличающийся тем, что:

- приготавливают среду для культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* на твердофазном субстрате, содержащем злаковые зерна, предпочтительно шелушенные зерна проса, например *Panicum miliaceum* L., которые смешивают с определенным процентом биологической жидкой среды;
- среду стерилизуют в аппарате для культивирования;
- после охлаждения среду инокулируют одним из выбранных штаммов микроорганизма *Pythium oligandrum*;
- после охлаждения среду инокулируют штаммом микроорганизма *Pythium oligandrum*;
- микроорганизм *Pythium oligandrum* культивируют в указанной среде;
- собранный биомассу по завершении процесса культивирования перерабатывают, получая концентрат суспензии;
- после завершения фазы культивирования микроорганизма *Pythium oligandrum* на твердофазном субстрате биомассу гомогенизируют в соответствующем объеме деминерализованной воды таким образом, чтобы окончательный размер как минимум 95% частиц в суспензии находился в пределах от 0,050 до 0,300 мм;
- полученную гомогенизированную суспензию, характеризующуюся определенным количеством ооспор, далее нормализуют до предварительно заданной концентрации ооспор, подходящей для получения жидкого биологического противогрибкового препарата.

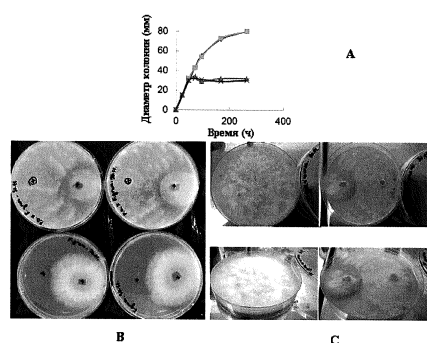
13. Способ по одному из пп.11 или 12, отличающийся тем, что в части, касающейся безводной суспензии микроорганизма *Pythium oligandrum*:

- материал, полученный после завершения стадии культивирования на твердофазном субстрате или в жидкой фазе, гомогенизируют таким образом, чтобы окончательный размер как минимум 95% частиц в суспензии находился в пределах 0,050-0,300 мм;
- полученную гомогенную суспензию, характеризующуюся определенным количеством ооспор, далее центрифугируют и
- после удаления надосадочной жидкости к подвергнутому центрифугированию материалу при необходимости добавляют масло для достижения предварительно заданной концентрации ооспор для получения жидкого биологического противогрибкового препарата;
- полученный материал ресуспендируют.

14. Способ по одному из пп.10-12, отличающийся тем, что после гомогенизации и нормализации суспензию отделяют, например фильтруют, до предварительно заданного размера частиц с целью обеспечения максимально допустимого размера частиц микроорганизма *Pythium oligandrum* в пределах от 0,050 до 0,300 мм.

15. Способ по одному из пп.11-14, отличающийся тем, что размер частиц в суспензии находится в пределах предпочтительно от 0,050 до 0,125 мм.

16. Способ по одному из пп.11-14, отличающийся тем, что водная суспензия стабилизирована в процессе стабилизации добавкой осмолита и хранится в стерильном контейнере большого объема при температуре ниже 8°C.



Фиг. 1А-1С



А

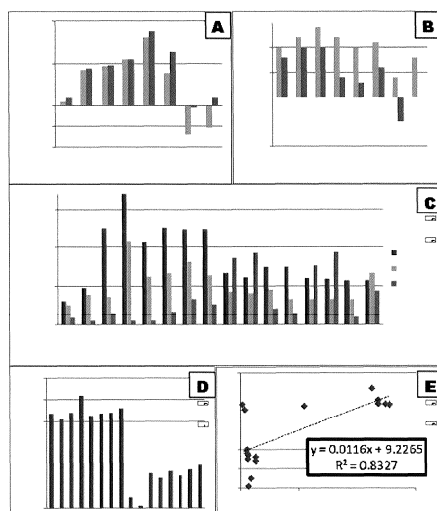


В

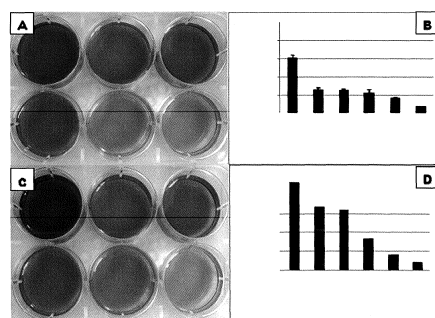


С

Фиг. 2А-2С



Фиг. 3А-3Е



Фиг. 4А-4D

