



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00351**

(22) Data de depozit: **05.05.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.12.2012** BOPI nr. **12/2012**

(41) Data publicării cererii:
30.03.2011 BOPI nr. **3/2011**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
PLANTELOR,**
*BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN,** *STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **ȘTEFAN AURORA LILIANA,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **CONSTANTINESCU FLORICA,**
*STR.EMANOIL PORUMBARU NR.67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **LUPU CARMEN,** *INTRAREA BÂRSEI
NR.5, BL.G 3, AP.25, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **ILIESCU HORIA,** *ALEEA STĂNILĂ NR.2,
BL.H 12, AP.12, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2003/0211081 A1; US 2003/0165470 A1

(54) **BIOPREPARAT MIXT PENTRU COMBATEREA BIOLOGICĂ A
CIUPERCILOR TOXIGENE DIN GENUL *FUSARIUM***



RO 126081 B1

1 Invenția se referă la un biopreparat mixt, destinat combaterii biologice a ciupercilor
toxigene din genul *Fusarium*.

3 Sunt cunoscute o serie întreagă de biopreparate mixte, destinate combaterii
ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*, și, în special, a celor care produc înroșirea/fusarioza
5 spicului, boală care duce la compromiterea recoltei la culturile de grâu și orz.

7 **US 2003/0211081 A1** descrie un biopreparat mixt, realizat pe baza tulpinii de
Pantoea agglomerans ATCC PTA 3460 și a tulpinii de *Bacillus megaterium* ATCC PTA 3461.
Biopreparatul este formulat ca pulbere umectabilă și este destinat tratamentului în vegetație,
9 prin pulverizarea, pe spicele de grâu, a suspensiei rezultate prin dispersarea în apă a pulberii
umectabile.

11 **US 2003/0165470 A1** prezintă tulpina NRLL B-30312 de *Bacillus subtilis*, care este
destinată reducerii atacului de înroșire a spicului la grâu și orz. Această tulpină de *B. subtilis*
13 a fost selectată în cadrul unui proces de screening biologic mai larg, împreună cu alte patru
tulpini de microorganisme antagoniste (*Torula aurea*, număr de depozit NRRL Y-30213, o
15 drojdie neidentificată, cu număr de depozit NRRL Y-30214, *Torula sp.*, depozită cu numărul
NRRL Y-30215 și *Cryptococcus nodaensis*, număr de depozit NRRL Y-30216). Cele 5 tulpini
17 de microorganisme antagoniste sunt destinate aplicării, singure sau în amestec, pe spicele
de grâu în formare, cu scopul de a limita stabilirea, penetrarea și dezvoltarea tulpinilor
19 toxigene din grupul *Fusarium graminearum*.

21 Dezavantajul biopreparatelor mixte descrise mai sus este faptul că se aplică
preponderent ca tratament al spicelor în curs de formare, acest tip de protecție împotriva
ciupercilor microscopice toxigene fiind influențat semnificativ atât de reacția plantei gazdă,
23 cât și de condițiile specifice agroclimatice.

25 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un biopreparat mixt,
care să poată fi aplicat preventiv, prin stropire pe resturile vegetale, pentru a limita
dezvoltarea populațiilor de ciuperci toxigene, sporularea acestora și formarea inoculului
27 primar care susține dezvoltarea bolii în următorul ciclu de vegetație.

29 Biopreparatul mixt, destinat combaterii biologice a ciupercilor toxigene din genul
Fusarium, conform invenției, este realizat pe baza a două tulpini de microorganisme
antagoniste, *Saccharomyces cerevisiae* L30, număr de depozit NCAIM Y001350, și *Bacillus*
31 *subtilis* B49b, număr de depozit NCAIM B001360, și este constituit din: 1...20% biomasă de
microorganisme antagoniste, sub formă de suspensie concentrată, rezultată din cultivare pe
33 diferite medii, cu concentrație în propagule de 10^6 ... 10^{11} celule/ml, 2...15% nutrienți, 5...15%
amestec de surfactanți anionici și neionici, 0,1...0,5% îngroșant, 10...50% solvent ecologic,
35 0,01...1% stabilizator, 1...10% anticongelant, 15...50% apă distilată până la 100%
greutate/volum.

37 Avantajele biopreparatului conform invenției sunt următoarele:

39 - acțiune sinergică a celor două componente biologice în limitarea dezvoltării
ciupercilor toxigene din grupul *Fusarium graminearum*;

- diluare ușoară în apa cu care se vor aplica prin pulverizare peste resturile vegetale;

41 - consum redus de energie, pentru că biomasa se condiționează sub formă de
suspensie, fără a mai fi necesară o etapă de uscare, intens energofagă.

43 Biomasa de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* L30 și de bacterie *Bacillus subtilis*
B49b, separate sub formă de suspensii concentrate din mediul lor de cultivare, este utilizată
45 pentru realizarea unor biopreparate sub formă de microemulsii, în care microorganismele
antagoniste își păstrează viabilitatea și caracteristicile biologice, și care sunt ușor de diluat
47 și de aplicat pe resturile vegetale.

RO 126081 B1

Biomasa de drojdii utilizată în exemplele de realizare a invenției a fost obținută prin decantare din plămădă fermentată, iar biomasa de *Bacillus subtilis* a fost obținută după cultivarea pe un mediu obținut prin zaharificarea borhotului rezultat de la fabricarea bioetanolului din boabe de grâu și separarea prin centrifugare. Compozițiile conform invenției, descrise mai jos, pot fi însă realizate cu biomasă de microroganisme antagoniste, obținute prin cultivare pe orice alt mediu de cultură, lichid sau semisolid, din care biomasa poate fi separată prin tehnicile uzuale de decantare, centrifugare sau filtrare.

Compozițiile sub formă de microemulsii conform invenției sunt constituite din:

- a) 1...20% biomasă de microorganisme, suspensie concentrată, cu concentrație în propagule de 10^6 ... 10^{11} celule/ml (recomandabil între 4 și 8% din fiecare dintre cele două componente biologice, biomasa de drojdii antagoniste și de bacterii gram pozitive sporulate);
- b) 2...15% nutrienți selectați dintre sucroză, amidon, glicerină, recomandat 4...10%;
- c) 5...15% amestec de surfactanți anionici, selectați dintre fosfați de tristirilfenol etoxilați, alchilbenzen sulfonați de sodiu, alchilbensulfonați de calciu și neionici, selectați dintre nonilfenoli etoxilați, ulei de ricin polietoxilat, alcooli C_{12-14} etoxilați, oleil poliglicoleter, Tween 20, Tween 80, în raport 1:9...9:1, recomandat fiind raportul 3,5:1... 4,5:1;
- d) 0,1...0,5% îngroșant selectat dintre carboximetilceluloză, sare de sodiu, xantangum, alcool polivinilic, recomandat 0,2...0,3%;
- e) 10...50% solvenți ecologici, selectați dintre esteri metilici sau etilici ai acizilor grași obținuți din uleiuri vegetale sau grăsimi animale, recomandat 25...40%;
- f) 0,01...1% stabilizatori selectați dintre benzoat de sodiu și cicloat de sodiu, recomandat 0,1...0,3%;
- g) 1...10% anticongelanți selectați dintre mono-, di- și polietilenglicol, mono-, di- și polipropilenglicol, glicerină, recomandat 2...5%;
- h) 15...50% apă distilată până la 100%.

Compozițiile sub formă de microemulsii se obțin în trei etape: i. prepararea fazei organice prin dizolvarea surfactanților în solvent; ii. prepararea fazei apoase prin dizolvarea substanțelor solide (nutrient, stabilizator) în apă distilată și omogenizarea soluției obținute cu suspensia concentrată de microorganisme, anticongelantul și îngroșantul (sub formă de soluție apoasă 2...7%); iii. prepararea microemulsiei prin picurarea sub agitare a fazei organice peste faza apoasă.

În continuare, se dau două exemple de realizare a compozițiilor conform invenției.

Exemplul 1. Boabele de grâu (contaminate cu DON, 1200 mcg/kg) se macină semifin pe sita de 0,2 mm. 100 g din măcinișul de grâu sunt amestecate, într-un Erlenmayer de 1 l, cu 400 ml apă sterilă. Peste amestec, se adaugă 0,4 g de α -amilază bacteriană (200 UI/ml, 1 UI fiind cantitatea care eliberează 1 micromol grupări glucidice reducătoare per minut) și 0,3 ml soluție dintr-o soluție 1 mM de clorură de calciu. Amestecul este apoi gelifiat prin autoclavare, timp de 5 min, la 105°C. Amestecul este supus agitării continue la o temperatură de 95°C, timp de 2 h, pentru solubilizarea amidonului prin dextrinizare de către α -amilază. După solubilizare, amestecul este răcit la o temperatură de 55°C, prin adăugare de 200 ml apă, iar pH-ul este ajustat la 5,5, cu acid clorhidric diluat. Se adaugă amiloglucozidază fungică (0,5 ml, 300 UI/ml, 1 UI este cantitatea de enzimă care eliberează 1 micromol glucoză per minut) peste amestec și se menține la o temperatură de 55°C, timp de 8 h, pentru zaharificarea completă a amestecului. Apoi, amestecul se răcește la 30°C, iar pH-ul se ajustează la 5, cu hidroxid de amoniu diluat. Din amestecul zaharificat, se separă, prin filtrare, partea insolubilă (borhotul, coprodusele uscate), care sunt filtrate pe pânne sub vid, pentru reducerea umidității la maximum 75%. Peste 200 ml din plămada zaharificată astfel obținută, se adaugă 25 ml dintr-un inocul de drojdii *S. cerevisiae*, tulpina L30, cu un conținut de 1×10^6 celule vegetative/ml.

RO 126081 B1

1 Amestecul cu drojdie - plămadă zaharificată se menține la 30°C, timp de 3 zile, pentru
fermentare. După cele 3 zile de fermentație, din amestecul fermentat sunt separate prin
3 centrifugare coprodusele solubile, iar supernatantul este supus procedurii de distilare. În
coprodusele solubile de distilerie recuperate prin centrifugare (și care conțin drojdia de
5 fermentație), se determină refractometric substanța uscată.

Borhotul (coprodusele uscate de distilerie) se amestecă cu o soluție de acid sulfuric
7 1%, în raport de 1 g la 5 ml acid, și se lasă peste noapte. Se neutralizează acidul cu hidroxid
de amoniu 1% și se zaharifică cu celulază fungică (100 UI/ml, 11 UI fiind cantitatea de
9 enzimă care eliberează 1 micromol de grupări enzimactice per minut). La atingerea unei
concentrații de circa 50 g/l glucoză (determinată prin reacția colorimetrică cu reactiv
11 dinitrosalicilic), se filtrează mediul, iar supernatantul se autoclavează, se răcește și se
inoculează cu 10 ml suspensie 10^8 ufc/ml *Bacillus subtilis* B49b. Se cultivă timp de 48 h,
13 după care se recuperează biomasa și se condiționează sub formă de microemulsie,
împreună cu biomasa de drojdie.

15 Se obține următoarea compoziție sub formă de microemulsie: 10% biomasa de
microorganisme (5% suspensie concentrată de microorganisme antagoniste *Saccharomyces*
17 *cerevisiae* L30, cu concentrație în propagule de 6×10^8 ufc/ml; 5% suspensie concentrată de
Bacillus subtilis B49b, cu concentrație de 5×10^9 ufc/ml); 9...10% fosfat de tristirilfenol etoxilat
19 cu 16 moli etilenoxid, 2...3% alcool C_{12-14} etoxilat cu 3 moli etilenoxid, 3% polietilenglicol,
4,5...5,5% sucroză, 4,5...5,5% carboximetilceluloză, soluție apoasă 5%, 0,2% benzoat de
21 sodiu, 30% solvent ecologic (esteri metilici ai acizilor grași obținuți din ulei de floarea
soarelui), apă distilată până la 100%, procente fiind exprimate în greutate/volum. Se
23 prepară faza organică prin dizolvarea fosfatului de tristirilfenol etoxilat cu 16 moli etilenoxid
și a alcoolului C_{12-14} etoxilat cu 3 moli etilenoxid în solventul ecologic. Se prepară faza
25 apoasă prin dizolvarea sucrozei și a benzoatului de sodiu în ~80% din cantitatea necesară
de apă distilată și omogenizarea soluției obținute cu suspensia concentrată de micro-
27 organisme, polietilenglicolul și soluția apoasă 5% carboximetilceluloză. Microemulsia se
obține prin picurarea sub agitare a fazei organice peste faza apoasă, completarea cu apă
29 distilată până la 100% greutate/volum și amestecarea sub agitare, până la obținerea unei
microemulsii omogene. Biopreparatul sub formă de microemulsie prezintă 95% viabilitate a
31 propagulelor de microorganisme.

Exemplul 2. Biomasa se obține ca în exemplul de mai sus. Se prepară o
33 microemulsie conform exemplului 1, cu următoarea compoziție: 15% suspensie concentrată
de microorganisme antagoniste (7,5% suspensie concentrată de microorganisme
35 antagoniste *Saccharomyces cerevisiae* L30, cu concentrație în propagule de 6×10^8 ufc/ml;
7,5% suspensie concentrată de *Bacillus subtilis* B49b, cu concentrație de 5×10^9 ufc/ml);
37 9,5...10,5% fosfat de tristirilfenol etoxilat cu 16 moli etilenoxid, 2,5...3,5% alcool C_{12-14} etoxilat
cu 3 moli etilenoxid, 3% polietilenglicol, 5...6% sucroză, 4,5... 5,5% carboximetilceluloză,
39 soluție apoasă 5%, 0,2% benzoat de sodiu, 30% solvent ecologic (esteri metilici ai acizilor
grași obținuți din ulei de floarea soarelui), apă distilată până la 100%, procente fiind
41 exprimate în greutate/volum.

Biopreparatul realizat prezintă 97% viabilitate a propagulelor de microorganisme.

RO 126081 B1

Revendicări

1. Biopreparat mixt, destinat combaterii biologice a ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*, realizat pe baza a două tulpini de microorganisme antagoniste, *Saccharomyces cerevisiae* L30, număr de depozit NCAIM Y001350, și *Bacillus subtilis* B49b, număr de depozit NCAIM B001360, și constituit din: 1...20% biomasă de microorganisme antagoniste, sub formă de suspensie concentrată, rezultată din cultivare pe diferite medii, cu concentrație în propagule de $10^6 \dots 10^{11}$ celule/ml, 2...15% nutrienți, 5...15% amestec de surfactanți anionici și neionici, 0,1...0,5% îngroșant, 10...50% solvent ecologic, 0,01...1% stabilizator, 1...10% anticongelant, 15...50% apă distilată până la 100% greutate/volum. 3 5 7 9
2. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** surfactanții anionici sunt aleși dintre fosfat de tristirilfenol polietoxilat cu 16 moli etilenoxid, alchilbenzen sulfonați de sodiu și alchilbenzensulfonați de calciu. 11 13
3. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** surfactanții neionici sunt aleși dintre nonilfenol polietoxilat cu 8...10 moli etilenoxid, ulei de ricin polietoxilat cu 30...40 moli etilenoxid, oleil poliglicoleter, alcoolii C_{12-14} polietoxilați cu 3...8 moli etilenoxid, Tween 20, Tween 80. 15 17
4. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** raportul dintre surfactanții anionici și cei neionici este 1:9...9:1. 19
5. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** nutrienții sunt aleși dintre sucroză, amidon și glicerină. 21
6. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** agenții de îngroșare sunt aleși dintre carboximetilceluloză, sare de sodiu, xantangum și alcool polivinilic. 23
7. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** solvenții ecologici sunt aleși dintre esteri metilici sau etilici ai acizilor grași obținuți din uleiuri vegetale sau grăsimi animale. 25 27
8. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** stabilizatorii sunt aleși dintre benzoat de sodiu și cicloat de sodiu. 29
9. Biopreparat conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** anticongelanții sunt aleși dintre mono-, di- și polietilenglicol, mono-, di- și polipropilenglicol și glicerină. 31



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit sub comanda nr. 655/2012