



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00351

(22) Data de depozit: 05.05.2009

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

(71) Solicitant:  
• 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.D7, 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.G3, SC.A, ET.2, AP.25, SECTOR  
3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ILIESCU HORIA, ALEEA STĂNILĂ NR.2,  
BL.H12, AP.12, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO

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

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o compoziție de biopreparat mixt, pentru combaterea biologică a ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*, alcătuită din 1...20% suspensie concentrată de microorganisme antagonice, constând din *Saccharomyces cerevisiae* L30 (număr depozit NCAIM Y001350) și *Bacillus subtilis* B49b (număr depozit NCAIM (P) B001360), preferabil între 4

și 8% din fiecare dintre cele două componente biologice, 2...15% nutrienți, 5...15% amestec de surfactanți anionici și neionici, 10...50% un solvent ecologic, 0,01...1% un stabilizator, 1...10% un anticoagulant, și până la 100% apă distilată.

Revendicări: 9

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



6

## Biopreparat mixt pentru combaterea biologică a ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*

Prezenta invenție se referă la un biopreparat mixt, 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 (P) B001360), și destinat combaterii biologice a ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*.

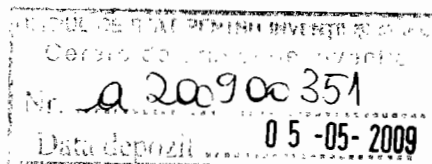
Sunt cunoscute o serie întregă de biopreparate mixte destinate combaterii ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*, și în special a celor care produc înroșirea / fusarioza spicului, boală care duce la compromiterea recoltei la culturile de grâu și orz. Brevetul SUA 7,118,739 descrie un biopreparat mixt, realizat pe baza tulpinii de *Pantoea agglomerans* ATCC PTA 3460 și a tulpinii de *Bacillus megaterium* ATCC PTA 3461. Biopreparatul descris în brevetul SUA 7,118,739 este formulat ca pulbere umectabilă și este destinat tratamentului în vegetație, prin pulverizarea pe spicele de grâu a suspensiei rezultate prin dispersarea în apă a pulberii umectabile.

Brevetul SUA 7,001,755 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* 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 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). Tulpinile de drojdii antagoniste izolate împreună cu tulpina de *B. subtilis* NRLL B-30312 reprezintă obiectul brevetului SUA 6,526,337. Cele 5 tulpini 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 toxigene din grupul *Fusarium graminearum*.

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 cât și de condițiile specifice agro-climatice.

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 primar care susține dezvoltarea bolii în următorul ciclu de vegetație.

Biomasa de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* L30 și de bacterie, *Bacillus subtilis* B49b, separată sub formă de suspensii concentrate din mediul lor de cultivare, este utilizată pentru realizarea unor biopreparate sub forma de microemulsii, în care



microorganismele antagoniste își păstrează viabilitatea și caracteristicile biologice și care sunt ușor de diluat și de aplicat pe resturile vegetale.

Biomasa de drojdii utilizată în exemplele de realizare a brevetului 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 brevetului, descrise mai jos, pot fi însă realizate cu biomasă de microorganism 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% biomasa de microorganism, 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, biomasă 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 raportul 3,5:1... 4,5:1
- d) 0,1 – 0,5% îngroșant selectat dintre carboximetilceluloză, carboximetil-celuloză sare de sodiu, xantangum, alcoolpolivinilic, 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, cicloat de sodiu, recomandat 0,1 – 0,3%
- g) 1 – 10% anticongelanți selectați dintre mon-, 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 microorganism, anticongelantul și îngroșantul (sub formă de soluție apoasă 2 – 7%); *iii.* prepararea microemulsiei prin picurarea sub agitare a fazei organice peste faza apoasă.

Avantajele compozițiilor descrise conform invenției sunt următoarele:



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

În continuare se dau 2 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  $\alpha$ -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 minute la 105°C. Amestecul este supus agitării continue la o temperatură de 95°C timp de 2 ore pentru solubilizarea amidonului prin dextrinizare de către  $\alpha$ -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 ore 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 pânză sub vid pentru reducerea umidității la max. 75%. Peste 200 ml din plămada zaharificată astfel obținută se adaugă 25 ml dintr-un inocul de drojzii *S. cerevisiae* tulpina L30, cu un conținut de  $1 \times 10^6$  celule vegetative/ml.

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 centrifugare coprodusele solubile, iar supernatantul este supus procedurii de distilare. În coprodusele solubile de distilerie recuperate prin centrifugare (și care conțin drojdia de fermentație) se determină refractometric substanța uscată.

Borhotul (co-produsele uscate de distilerie) se amestecă cu o soluție de acid sulfuric 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, 1 l UI fiind cantitatea de enzimă care eliberează 1 micromol de grupări enzimatică per minut). La atingerea unei concentrații de circa 50 g/l glucoză (determinată prin reacția colorimetrică cu reactiv 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 ore, după care se recuperează biomasa și se condiționează sub formă de microemulsie împreună cu biomasa de drojdie.

Se obține următoarea compoziție sub formă de microemulsie: 10% biomasă de microorganisme (5% suspensie concentrată de microorganisme antagoniste *Saccharomyces cerevisiae* L30, cu concentrație în propagule de  $6 \times 10^8$  ufc/ml; 5% suspensie concentrată de *Bacillus subtilis* B49b, cu concentrație de  $5 \times 10^9$  ufc/ml); 9 – 10% fosfat de tristirilfenol etoxilat cu 16 moli etilenoxid, 2 – 3% alcool C<sub>12-14</sub> etoxilat cu 3 moli etilenoxid, 3% polietilenglicol, 4,5 – 5,5% sucroza, 4,5 – 5,5% carboximetilceluloză 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 exprimate în greutate/volum. Se prepară faza organică prin dizolvarea fosfatului de tristirilfenol etoxilat cu 16 moli etilenoxid și a alcoolului C<sub>12-14</sub> etoxilat cu 3 moli etilenoxid în solventul ecologic. Se prepară faza 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 microorganisme, polietilenglicolul și soluția apoasă 5% carboximetilceluloză. Microemulsia se obține prin picurarea sub agitare a fazei organice peste faza apoasă, completarea cu apă 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 propagulelor de microorganisme.

## Exemplul 2

Biomasa se obține ca în exemplul de mai sus. Se prepară o microemulsie conform exemplului 1 cu următoarea compoziție: 15% suspensie concentrată de microorganisme antagoniste (7,5% suspensie concentrată de microorganisme antagoniste *Saccharomyces cerevisiae* L30, cu concentrație în propagule de  $6 \times 10^8$  ufc/ml; 7,5% suspensie concentrată de *Bacillus subtilis* B49b, cu concentrație de  $5 \times 10^9$  ufc/ml); 9,5 – 10,5% fosfat de tristirilfenol etoxilat cu 16 moli etilenoxid, 2,5 – 3,5% alcool C<sub>12-14</sub> etoxilat cu 3 moli etilenoxid, 3% polietilenglicol, 5 – 6% sucroză, 4,5 – 5,5% carboximetilceluloză 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 exprimate în greutate/volum.

Biopreparatul realizat prezintă 97% viabilitate a propagulelor de microorganisme.



## Revendicări

1. Biopreparat mixt, 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, destinat combaterii biologice a ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*, **caracterizate prin aceea că** este constituit din 1 – 20% biomasă de microorganisme antagoniste, sub formă de suspensie concentrată rezultată din cultivare pe diferite medii, cu concentrație în propagule de  $10^6$  –  $10^{11}$  celule/ml, 2 – 15% nutrienți, 5 – 15% amestec de surfactanți anionici și neionici, 0,1 – 0,5% îngrășant, 10 – 50% solvent ecologic, 0,01 – 1% stabilizator, 1 – 10% anticongelant, 15 – 50% apă distilată, până la 100% greutate/volum.
2. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** surfactanții anionici sunt aleși dintre: fosfat de tristirilfenol polietoxilat cu 16 moli etilenoxid, alchilbenzen sulfonați de sodiu, alchilbenzensulfonați de calciu.
3. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate 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, alcooli  $C_{12}$  –  $C_{14}$  polietoxilați cu 3 – 8 moli etilenoxid, Tween 20, Tween 80.
4. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** raportul dintre surfactanții anionici și cei neionici este 1:9...9:1.
5. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** nutrienții sunt aleși dintre: sucroză, amidon, glicerină.
6. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** agenții de îngroșare sunt aleși dintre: (de tipul) carboximetilceluloză, carboximetil-celuloză sare de sodiu, xantangum, alcool polivinilic.
7. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** solvenții ecologici sunt aleși dintre: esteri metilici sau etilici ai acizilor grași obținuți din uleiuri vegetale sau grăsimi animale.
8. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** stabilizatorii sunt aleși dintre: benzoat de sodiu, cicloat de sodiu.
9. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** anticongelanții sunt aleși dintre: mono-, di- si polietilenglicol, mono-, di- si polipropilenglicol, glicerină.

