



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00350

(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:
• SESAN TATIANA, B-DUL IULIU MANIU
NR.55, BL.17, AP.208, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• 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;
• LUPU CARMEN, INTRAREA BĂRSEI
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) **TULPINĂ ANTAGONISTĂ DE *TRICHODERMA VIRIDE* ȘI
PROCEDEU DE UTILIZARE A ACESTEIA PENTRU
BIOCONVERSIA BORHOTULUI DE LA FABRICAREA
ETANOLULUI ÎNTR-UN BIOPREPARAT ANTIFUNGIC**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină antagonistă de *Trichoderma Viridae* Td50, depusă sub numărul (P)001158, la NCAIM Budapesta, prezentând un caracter puternic antagonist față de o serie de ciuperci fitopatogene, și la un procedeu de utilizare a acesteia, pentru bioconversia borhotului de la fabricarea etanolului, într-un biopreparat antifungic, printrecerea borhotului de la fabricarea bioetanolului într-un amestecător în care se adaugă 0,4...0,5% superfosfat de potasiu, pentru normalizarea conținutului de potasiu, inocularea cu 0,1% biopreparat hidrogelificat pe bază de

Trichoderma viridae, obținut prin uscarea granulelor de ciuperci Td50, formate după cultivare pe un mediu Weidling agarizat, și apoi inoculate pe mediu hidrogelificat, de multiplicare industrială, timp de 7 zile, și menținerea timp de 7...8 zile a compoziției rezultate, cu amestecare la o frecvență de 1 rot/h, pentru aerarea substratului, rezultând un biopreparat cu eficiență ridicată în managementul fitosanitar al resturilor vegetale.

Revendicări: 2

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).



4

Tulpină antagonistă de *Trichoderma viride* și procedeu de utilizare a acesteia pentru bioconversia borhotului de la fabricarea etanolului într-un biopreparat antifungic

Prezentul brevet se referă la o tulpină antagonistă de *Trichoderma viride*, Td₅₀, depozitată cu numărul (P) 001358 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta, și la un procedeu de bioconversie a borhotului de la fabricarea etanolului într-un biopreparat antifungic prin utilizarea acestei tulpini antagoniste.

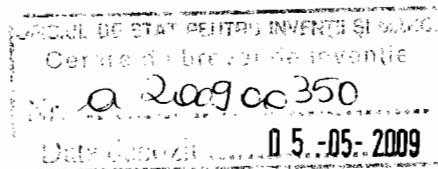
Sunt cunoscute mai multe tulpini de ciuperci antagoniste aparținând genului *Trichoderma*. Brevetul SUA 5 266 316 descrie izolatul T-39 de *Trichoderma harzianum* (depozitat cu numărul I-952 la Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Paris. Acest izolat are o rezistență ridicată la fungicide și este activ față de ciupercile producătoare de mucegaiuri (*Botrytis cinerea* și *Sclerotinia sclerotiorum*). Biopreparatul pe baza acestui izolat este obținut prin uscarea și granulara unei culturi pe mediu (semi)solid; acest mediu conține amidon ca sursă de carbon și celită ca suport pentru reținerea apei. Compoziția rezultată în final, care conține cel puțin 105 ufc/g, este destinată aplicării tratamentelor în vegetație.

Brevetul SUA 5 422 107 prezintă tulpina SK-55 de *Trichoderma harzianum*, număr de depozit BP 4346 NIBH, Japonia. Biopreparatul pe baza acestei tulpini este destinat pentru tratament la sol. Acest biopreparat este realizat prin cultivare septică, pe un mediu conținând tărâțe de grâu umectate la 90% apă, care este repartizat în tăvi de aluminiu.

Brevetul SUA 7 070 984 protejează tulpina Li49, depozitată la ATTC cu numărul PTA-1225. Tulpina este cultivată aseptice pe un mediu lichid, iar biomasa este recuperată și adăugată în proporție de cel puțin 10% într-un suport organic alcătuit din boabe de cereale, turbă și compost. Biopreparatul astfel rezultat este utilizat pentru tratamentul solului.

Nici una din tulpinile descrise până în prezent nu a fost destinată tratamentului resturilor vegetale și a reducerii pe această cale a inoculului primar de agenți fitopatogeni și, implicit, a riscurilor de dezvoltare epidemică a bolilor plantelor în următorul ciclu de vegetație. Nu au fost dezvoltate biopreparate pe bază de tulpini antagoniste din genul *Trichoderma* destinate managementului fitosanitar al resturilor vegetale și nici procedee de obținere a unor astfel de biopreparate.

Prezenta invenție descrie o tulpină de *Trichoderma viride* cu capacitate mare de colonizare a resturilor vegetale, utilizabilă pentru managementul fitosanitar al resturilor vegetale, și un procedeu de conversie a borhotului de la fabricarea etanolului într-un biopreparat antifungic destinat tratamentului resturilor vegetale.



Tulpina de *Trichoderma viride* Td₅₀, depozitată cu numărul (P) 001358 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta, a fost izolată de pe resturi vegetale. Procedeu de conversie a borhotului de la fabricarea etanolului într-un biopreparat antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀ cuprinde următoarele etape: (i) trecerea borhotului de la fabricarea (bio)etanolului într-un amestecător universal; (ii) adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5% pentru normalizarea pH-ului și a conținutului de potasiu; (iii) inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelifiate pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀, realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp pe 7 zile a ciupercilor Td₅₀ pe un mediu cu următoarea compoziție: 2 g of KH₂PO₄; 1,4 g of (NH₄)₂SO₄; 0,3 g of CaCl₂ · 2H₂O; 0,3 g of MgSO₄ · 7H₂O; 0,6 g uree; 10 mg of FeSO₄ · 7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄ · 2H₂O, 3,2 mg of CoCl₂ · 6H₂O, sirop de glucoză 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu Aquasorb, apă până la 1 litru; (iv) menținerea timp de 7 .. 8 zile a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră pentru aerarea substratului.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- tulpina Td₅₀, fiind izolată de pe resturi vegetale, are o mare capacitate de colonizare a unui astfel de substrat; această capacitate de colonizare, adăugată proprietăților antagoniste față de diferiți agenți fitopatogeni această capacitate asigură reducerea inoculului primar dezvoltat pe aceste resturi vegetale;
- procedeul de bioconversie folosit determină o exprimare ridicată a enzimelor care degradează material lignocelulozic, borhotul fiind un astfel de material rezultat din solubilizarea măcinișului de boabe de grâu cu amilaze
- procedeul de bioconversie include etape de normalizare a caracteristicilor fizico-chimice definitorii pentru dezvoltarea ciupercilor (cum este pH-ul și conținutul de fosfor), permițând astfel realizarea unui biopreparat cu proprietăți constante.

Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

Exemplu

Trichoderma viride Pers., tulpina Td₅₀, a fost izolată de pe resturi vegetale (vreji de fasole), din ferma Cornești – județul Dâmbovița. Încadrare taxonomică a tulpinii de *Trichoderma viride* Td₅₀ este: Filumul *Ascomycota*, Clasa *Sordariomycetes*, Ordinul *Hypocreales*, Familia *Hypocreaceae*, genul *Trichoderma*.

Caracteristicile morfologice ale tulpinii Td₅₀ sunt descrise mai jos.

Dezvoltarea coloniei: 4,5-7,5(-9,0) cm diametru după 5 zile, pe mediul CGA, inițial ± hialină, ulterior albicioasă-verde cu zone de mănunchiuri de conidiofori albastru-verzi; reversul coloniei necolorat;



Conidiofori: ramificați piramidal, cu ramuri mai scurte spre apex;

Fialide: în grupuri de 2-4, destul de subțiri și adesea curbate, de (6)8-14(-20) X 2.4-3,0 μm;

Conidii subgloboase sau elipsoidale, de 3,6-4,5 μm în diametru cu pereții aspri;

Clamidospori prezenți în miceliul culturilor mai vârstnice, intercalari și uneori terminali, cel mai adesea globoși, hialini, cu pereții netezi.

Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi, sunt descrise în cele ce urmează.

Surse de carbon: *optime*: manita, fructoza, riboza, glucoza (dextroza), galactoza, manoză; *dezvoltare fungală moderată* pe: arabinoză, sorboză, melibioză, maltoză, lactoză, celobioză, celuloză, amidon, inulină; *dezvoltare fungală slabă* pe: sorbitol, xiloză, zaharoză (sucroză), glicerol;

Surse de azot: *optime*: DL-leucina, L-cystina, DL-citrulina, DL-nor-leucină, azotatul de amoniu, tartratul de amoniu; *dezvoltare fungală moderată* pe: L-arginină, L-leucină, glicocol, asparagină, riboflavină, sulfat de amoniu, carbonat de amoniu, fosfat monobazic; *dezvoltare fungală slabă* pe: triptofan, tirozină, D-serină, lizină, uree, azotați de sodiu, calciu și potasiu;

Caracteristici fizice de creștere și sporulare sunt:

Temperatura: *temperatura optimă*: 20-25°C; *temperatura minimă*: 2°C; *temperatură maximă*: 37°C;

Reacția substratului de cultură: *pH optim*: 4.0-5.5; dezvoltare slabă a ciupercii la valori de pH de la 9,0 la 13,0.

Tulpina Td₅₀ este puternic antagonistă față de ciupercile fitopatogene: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium radicum* ș.a.

Pentru obținerea biopreparatului s-a aplicat următorul procedeu.

Tulpina Td₅₀ de *Trichoderma viride* este cultivată pe mediu Weidling agarizat, repartizat în eprubete cu mediu înclinat. Cultura de pe mediu agarizat este reluată și utilizată pentru inocularea mediului hidrogelificat, de multiplicare industrială (cu următoarea compoziție: 2 g of KH₂PO₄; 1,4 g of (NH₄)₂SO₄; 0,3 g of CaCl₂ · 2H₂O; 0,3 g of MgSO₄ · 7H₂O; 0,6 g uree; 10 mg of FeSO₄ · 7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄ · 2H₂O, 3,2 mg of CoCl₂ · 6H₂O, sirop de glucoză 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poli-acrilamidă și poli-acrilat de potasiu Aquasorb, apă până la 1 litru). Mediul hidrogelificat este repartizat în pungi de polietilenă, sterilizat prin autoclavare la 121°C și inoculat cu ciuperci *T. viride* Td₅₀. După 7 zile amestecul semisolid, hidrogelificat, rezultat este omogenizat cu un turbomixer și uscat pe sită de inox și hârtie de filtru, în curent de aer cald la 35°C.



Procedeu de conversie a borhotului de la fabricarea etanolului într-un biopreparat antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀ implică următoarele etape:

- trecerea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un amestecător universal;
- adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5% pentru normalizarea pH-ului și a conținutului de potasiu;
- inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelifiate pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀, realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp pe 7 zile a ciupercilor Td₅₀ pe un mediu cu următoarea compoziție: 2 g of KH₂PO₄; 1,4 g of (NH₄)₂SO₄; 0,3 g of CaCl₂ · 2H₂O; 0,3 g of MgSO₄ · 7H₂O; 0,6 g uree; 10 mg of FeSO₄ · 7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄ · 2H₂O, 3,2 mg of CoCl₂ · 6H₂O, sirop de glucoză 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poli(acrilamidă și poli(acrilat de potasiu Aquasorb, apă până la 1 litru;
- menținerea timp de 7 .. 8 zile a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră pentru aerarea substratului.

Biopreparatul astfel obținut a fost testat din punct de vedere al antagonismului față de *Fusarium graminearum* Schw. DSMZ 4527 (teleomorfa *Gibberella zea* Schw. Petch). Ciuperca toxigenă a fost cultivată pe mediu înclinat cartof – glucoză - agar. După 7 zile de creștere, cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH 7,2, adusă la 10⁶ ufc/ml și inoculată (0,1 ml / g) peste paie de grâu sterilizate prin autoclavare. Același tratament a fost aplicat și unor variante experimentale tratate aseptice (anterior, concomitent sau ulterior) cu biopreparat realizat conform exemplului (0,1 g la 10 g de paie) și cu inocul de *T. viride* Td₅₀ reluat de pe mediu Weidling agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie 10⁶ ufc/ml per g de paie).

Paiele au fost trecute apoi aseptice pe plăci Roux, închise cu dopuri de vată, care conțineau câte 5 g de vermiculit steril, umectat cu câte 5 ml de apă sterilă. Plăcile au fost incubate timp de 21 zile la 25°C și în lumină fluorescentă cu dominantă în UV apropiat (2 lămpi F40 BLB, două lămpi F40 CWX, Philips). Vermiculitul a fost re-umectat de două ori pe săptămâna. Captarea ascosporelor s-a realizat cu ajutorul unor lamele de microscop 25 x 75 mm, tratate cu silicon și plasate la 10 mm de gâtul plăcii Roux. După 21 de zile s-a lăsat vermiculitul să se usuce timp de 5 zile, după care a fost re-umectat abundant cu 7 ml de apă sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apotece. Spori captați în uleiul siliconi au fost numărați la microscop, pe 25% din suprafața lamelei. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în trei repetiții, iar întregul experiment a fost repetat o dată.



05-05-2009

Datele au fost interpretate pe baza testului Friedman pentru măsurări repetate. Rezultatele sunt prezentate în tab.1. de mai jos.

Tab.1. Influența aplicării biopreparatului pe bază tulpinii *T. viride* Td₅₀ și a suspensiei de ciuperci antagoniste *T. viride* Td₅₀ asupra producerii de ascospori de către *Fusarium graminearum* DSMZ 4527 (teleomorfa *Gibberella zea*).

Varianta experimentală	Ascospori ($\times 10^5$) per cm ² de substrat ^z	% față de martor
Martor, paie de grâu neinoculate cu microorganisme antagoniste, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per g de paie	12,2 a	-
Pre-inoculat cu biopreparat cf. ex.1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per g de paie	1,27 d	10,41
Inoculat concomitent cu biopreparat cf. ex.1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per g de paie	2,49 c	20,41
Post-inoculat cu biopreparat cf. ex.1, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per g de paie	3,72 c	30,49
Pre-inoculat cu 0,1 ml suspensie Td ₅₀ 10 ⁶ ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per g de paie	1,22 d	10,00
Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie Td ₅₀ 10 ⁶ ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per g de paie	2,43 c	19,92
Post-inoculat cu 0,1 ml suspensie Td ₅₀ 10 ⁶ ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per g de paie	5,15 b	42,21

z- valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru testul Friedman la 0,05 nivel de încredere.

Rezultatele demonstrează că tulpina Td₅₀ este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene *F. graminearum*. Tulpina condiționată sub formă de biopreparat este mai eficace în cazul aplicării după inocularea cu ciuperci toxigene. Acest fapt, similar celui care apare în condiții naturale, este datorat probabil exprimării semnificative a enzimelor implicate în metabolizarea substratului lignocelulozic în ciupercile Td₅₀ condiționate sub formă de biopreparat.



Revendicări

1. Tulpină antagonistă de *Trichoderma viride*, Td₅₀, depozitată cu numărul (P) 001358 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta, caracterizată prin aceea că este puternic antagonistă față de ciupercile fitopatogene: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium radicinum*
2. Procedeu de conversie a borhotului de la fabricarea etanolului într-un biopreparat antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀ caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: trecerea borhotului de la fabricarea (bio)etanolului într-un amestecător universal; adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5% pentru normalizarea pH-ului și a conținutului de potasiu; inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelifiate pe bază de *Trichoderma viride* Td₅₀, realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp de 7 zile a ciupercilor Td₅₀ pe un mediu cu următoarea compoziție: 2 g of KH₂PO₄; 1,4 g of (NH₄)₂SO₄; 0,3 g of CaCl₂ · 2H₂O; 0,3 g of MgSO₄ · 7H₂O; 0,6 g uree; 10 mg of FeSO₄ · 7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄ · 2H₂O, 3,2 mg of CoCl₂ · 6H₂O, sirop de glucoză 80% 15 ml, 7 g hidrogel superadsorbant pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu Aquasorb, apă până la 1 litru; menținerea timp de 7 .. 8 zile a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră pentru aerarea substratului.

