



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 01077**

(22) Data de depozit: **22.12.2009**

(41) Data publicării cererii:
30.06.2011 BOPI nr. **6/2011**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
PLANTELOR,**
B-DUL ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, OP 18, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SESAN TATIANA EUGENIA,**
BD. IULIU MANIU NR. 55, BL. 17, SC. E,
ET. 9, AP. 208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **LUPU CARMEN, INTRAREA BÂRSEI NR.5,
BL.G3, SC.A, ET.2, AP.25,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **BIOPREPARAT PE BAZĂ DE TRICHODERMA VIRIDE
PENTRU DEZVOLTAREA DE SOLURI SUPRESIVE PENTRU
FUSARIILE FITOPATOGENE ȘI TOXIGENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o tulpină de *Trichoderma viride* Td49, depusă cu numărul (P) 001357 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) Budapesta, puternic antagonistă față de ciuperci fitopatogene, și la un biopreparat antifungic, obținut prin trecerea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un amestecător, adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5%, pentru nor-

malizarea pH-ului și a conținutului de potasiu, inocularea cu 0,1% biopreparate hidrogelifiate pe bază de *Trichoderma viride* Td49 și menținerea compoziției rezultate timp de 7...8 zile sub amestecare cu o frecvență de 1 rot/h, pentru aerarea substratului.

Revendicări: 2



BIOPREPARAT PE BAZA DE *TRICHODERMA VIRIDE* PENTRU DEZVOLTAREA DE SOLURI SUPRESIVE PENTRU FUSARIILE FITOPATOGENE SI TOXIGENE

Prezentul brevet se referă la un biopreparat, destinat combaterii fusariilor fitopatogene și toxigene prin formare de soluri supresive, realizat pe baza unei tulpini antagoniste de *Trichoderma viride*, Td₄₉, depozitată cu numărul (P) 001357 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta, printr-un procedeu de bioconversie a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor comestibile.

Sunt cunoscute mai multe biopreparate pe bază de tulpini de ciuperci antagoniste aparținând genului *Trichoderma* și care sunt destinate tratamentului la sol în vederea formării de soluri supresive. Brevetul SUA 4.642.131 expune un compost supresiv pentru ciupercile care produc bolile complexului de răsărire (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp.), realizat pe baza tulpinilor de *Trichoderma hamatum* I382 (ATCC 20765) și/sau I 559 (ATCC20764), în combinație cu *Flavobacterium* spp. I 299 (ATCC 53199) și *Pseudomonas maltophila* I76 (ATCC53198).

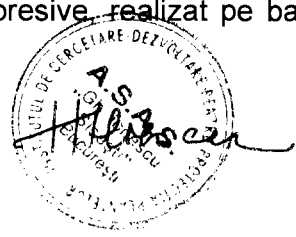
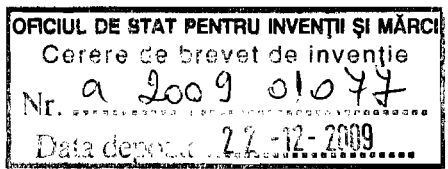
Brevetul SUA 5 422 107 prezintă tulpina SK-55 de *Trichoderma harzianum*, număr de depozit BP 4346 NIBH, Japonia. Biopreparatul pe baza acestei tulpini este destinat pentru tratament la sol. Acest biopreparat este realizat prin cultivare septică, pe un mediu conținând tărâțe de grâu umectate la 90% apă,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

Brevetul EP 1400 586 redă descrie un substrat de creștere supresiv realizat pe baza ciupercii antagoniste *Trichoderma asperellum* T34(2), depozitată CECT No 20147.

Nici una din biopreparatele sau tulpinile de *Trichoderma* descrise până în prezent nu a fost destinată dezvoltării de soluri supresive pentru fusariile fitopatogene și toxigene și reducerii pe această cale a riscurilor de dezvoltare epidemică a bolilor cerealelor boabe (înroșirea spicului de grâu produsă de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zae*; înflorirea albă a boabelor de porumb produsă *Fusarium verticilloides* / *Gibberella fujikuroi*) care sunt însoțite de contaminarea recoltei cu micotoxine.

Prezenta invenție se referă la un biopreparat destinat combaterii fusariilor fitopatogene și toxigene prin dezvoltare de soluri supresive, realizat pe baza unei



tulpini antagoniste de *Trichoderma viride* (Td₄₉ depozitată cu numărul (P) 001357 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta) cu capacitate mare de colonizare a resturilor vegetale și un procedeu de conversie a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un biopreparat antifungic destinat formării de soluri supresive.

Biopreparatul conform invenției are următoarea compoziție: materie organică totală 22... 27,5 părți, din care celuloză 10 .. 12,5 părți, lignină 5...6,5 părți, acizi humici 2,5... 3,5 părți, chitină 1,5... 2 părți, substanțe azotate total 2,5 ... 3,5 părți, substanțe minerale totale (cenușă) 5 ... 7,5 părți, apa până la 100 părți, părțile fiind exprimate în greutate. In biopreparat numărul de propagule de *Trichoderma viride* Td₄₉ este mai mare de 1 million per gram de produs.

Tulpina de *Trichoderma viride* Td₄₉, depozitată cu numărul (P) 001357 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, NCAIM, Budapesta, a fost izolată de pe resturi vegetale. Procedeu de conversie a a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un biopreparat antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td₄₉ cuprinde următoarele etape: (i) trecerea a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* 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* Td₄₉, realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp pe 7 zile a ciupercilor Td₄₉ 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(acril)amidă și poli(acril)at de potasiu Aquasorb, apă până la 1 litru; (iv) menținerea timp de 7 .. 8 zile a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvența de o rotație pe oră pentru aerarea substratului.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- tulpina Td₄₉, 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 diferiții agenți fitopatogeni această capacitate asigură reducerea inoculului primar dezvoltat pe aceste resturi vegetale;
- procedeul de bioconversie folosit determină o exprimare ridicată a chitinazelor și β-glucaazelor, substratul epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* fiind bogat în chitină și celuloză
- 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 Td₄₉, a fost izolată de pe resturi vegetale (tulei de porumb), din ferma experimentală a ICDPP București. Încadrare taxonomică a tulpinii de *Trichoderma viride* Td₄₉ este: Filumul *Ascomycota*, Clasa *Sordariomycetes*, Ordinul *Hypocreales*, Familia *Hypocreaceae*, genul *Trichoderma*.

Caracteristicile morfologice ale tulpinii Td₄₉ 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, manoza; *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 Td₄₉ este puternic antagonistă față de ciupercile fitopatogene: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticilloides*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia bataticola*, *Stemphylium radicum* ș.a.



Pentru obținerea biopreparatului s-a aplicat următorul procedeu.

Tulpina Td₄₉ 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 hidrogelifiat, 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 poliacrilamidă și poli-acrilat de potasiu Aquasorb, apă până la 1 litru). Mediul hidrogelifiat este repartizat în pungi de polietilenă, sterilizat prin autoclavare la 121°C și inoculat cu ciuperci *T. viride* Td₄₉. După 7 zile amestecul semisolid, hidrogelifiat, 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 substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor comestibile într-un biopreparat antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td₄₉ 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* Td₄₉, realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp pe 7 zile a ciupercilor Td₄₉ 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 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.

În biopreparatul astfel obținut s-au efectuat determinări de umiditate (gravimetric, după uscare la 104°C), materie organică totală și cenușă (gravimetric, după calcinare la 800°C), substanțe azotate totale (mineralizare umedă Kjeldahl), acizi humici (extracție NaOH 1M și precipitare cu HCl 1M), celuloză (colorimetric cu antronă, după extragere prealabilă a ligninei cu acid acetic și acid nitric); chitină (determinarea colorimetrică a N-acetilglucozaminei după hidroliză în HCl 6M).

Analizele au fost repetate de trei ori, iar conținutul determinat a fost următorul: materie organică totală 22... 27,5% (celuloză 10 .. 12,5%, lignină 5...6,5%, acizi humici 2,5... 3,5%, chitină 1,5... 2%, substanțe azotate total 2,5 ... 3,5%), substanțe minerale totale (cenușă) 5 ... 7,5%, apă 65 ... 73%.



Din biopreparat a fost determinat și numărul de ciuperci antagoniste *Trichoderma viride*, folosindu-se următoarea formulă de mediu selectiv: 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,9 g K_2HPO_4 , 1,0 g of NH_4NO_3 , 0,15 g KCl, 0,15 g roz Bengal, 3 g glucoză, 20 g agar, apă până la 1 litru (William *et al*, 2003, A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost, Appl. Envir. Microb., 68, 4190-4191).

Mediul a fost sterilizat prin autoclavare (la 121°C timp de 15 min) și distribuit în plăci petri cu diametrul de 9 mm. Din biopreparat s-au prelevat probe, care au fost omogenizate. Din omogenizat s-a reluat 1 g care s-a suspendat în 10 ml. Din suspensie s-au reluat 1 ml, care a fost diluat zecimal de 5 ori și apoi inoculat pe mediu selectiv. În toate analizele efectuate numărul de propagule de *T. viride* Td49 per gram de biopreparat a fost mai mare de 10^6 ufc.

Biopreparatul propus conform invenției reprezintă de fapt o etapă de reciclare conform unui ciclu integrat asemănător celor naturale. Prin cultura ciupercilor lignocelulozice (și mai ales a celor din genul *Pleurotus*) materialul vegetal rezultat ca subprodus agricol (paie de grâu, de ex.) este convertit într-un produs agroalimentar cu valoare biologică și comercială ridicată (bureți păstrăvi). Ciupercile lignocelulozice consumă preponderent celuloza (care se degradează hidrolitic la glucoză, utilizată ca sursă de carbon și de energie) și oxidează parțial lignina (polimer care se degradează oxidativ, printr-un proces denumit și de "combustie enzimatică"). Substratul epuizat, care conține celuloză înalt organizată rezistentă la biodegradare, lignina parțial oxidată și miceliu de *Pleurotus* în faza finală a ciclului biologic (bogat în chitina și betaglucan) este convertit într-un biopreparat pentru dezvoltarea de soluri supresive pentru un patogen major al culturii de grâu.

Biopreparatul pe bază de *T. viride* Td49 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 10^6 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* Td49 reluat de pe mediu Weidling agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 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 apropiată (2 lămpi F40 BLB, două lămpi F40 CWX, Philips). Vermiculitul a fost re-umectat de două ori pe săptămâna.



Captarea ascospurilor 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 abundent cu 7 ml de apă sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apotecii. 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 experimentul a fost repetat o dată. 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* Td49 și a suspensiei de ciuperci antagoniste *T. viride* Td49 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	12,1 a	-
Pre-inoculat cu biopreparat cf. ex.1, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	1,22 d	10,08
Inoculat concomitent cu biopreparat cf. ex.1, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	2,24 c	18,51
Post-inoculat cu biopreparat cf. ex.1, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	3,23 c	26,69
Pre-inoculat cu 0,1 ml suspensie Td49 10^6 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	1,15 d	9,50
Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie Td49 10^6 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	2,14 c	17,68
Post-inoculat cu 0,1 ml suspensie Td49 10^6 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10^6 ufc/ml per g de paie	4,59 b	37,93

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

Rezultatele demonstrează că tulpina Td₄₉ este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene *F. graminearum*. Tulpina condiționată sub formă de biopreparat este mai eficientă 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 și cu chitină în ciupercile Td₄₉ condiționate sub formă de biopreparat.

S-a realizat și un experiment pentru a se evidenția capacitatea biopreparatului realizat, pe baza ciupercii *T. viride* Td₄₉, în formarea unor soluri supresive. S-a lucrat în condiții de seră. Inoculul fungic (de *Fusarium graminearum* DSMZ 4527) s-a obținut în plăci Roux, pe mediul natural alcătuit din boabe de ovăz dublu sterilizate la 1 atm. timp de 20 minute, prin inocularea cu miceliu și incubarea la 27°C timp de 3-4 zile.

Substratul utilizat în sera a constat din 1/2 pământ de grădina + 1/4 mranita + 1/4 nisip. Acesta a fost sterilizat prin iradiere gamma (2,5 KGy) și apoi amestecat uniform cu inoculul fungic ($\sim 2 \times 10^6$ spori/ kg sol) și distribuit în tavi din plastic (32/24 cm) cu 48 ore înainte de semănat. Cu 12 ore înainte de semănat s-a aplicat biopreparatul pe bază de *T. viride* Td₄₉, în cantitate de 1 g la 1 kg de sol.

În substratul astfel pregătit au fost semănat boabe de grâu. După 15 și 20 zile s-a determinat numărul de plante răsărite și uniform dezvoltate. Rezultatele sunt prezentate în tab. 2, comparative cu un martor netratat și cu un tratament chimic.

Tab. 2. Eficacitatea biopreparatului în prevenirea atacului de *Fusarium graminearum* la plantulele de grâu (cv. Boema)

Varianta	Tratament	%plante răsărite	
		15 zile	20 zile
Substrat sterilizat prin iradiere, netratat	-	96,6	96,6
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , netratat	-	12,6	11,2
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , Propamocarb-HCl	Stropire sol, 0,2% i.a., 12 ore înainte de semănat	89,6	87,6
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , biopreparat Td ₄₉	Incorporare 1g per kg sol 12 ore înainte de semănat	91,2	89,4

Rezultatele susțin faptul că biopreparatul realizat, pe baza ciupercii antagoniste *T. viride* Td₄₉, are capacitatea de a forma soluri supresive pentru fusiile fitopatogene și toxigene.



Revendicări

1. Biopreparat pentru dezvoltarea de soluri supresive pentru fusariile fitopatogene și toxigene caracterizat prin aceea că este obținut printr-un procedeu de conversie a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor 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* Td49, realizate prin uscarea granulelor formate după cultivarea timp pe 7 zile a ciupercilor Td49 pe un mediu cu următoarea compoziție: 2 g of KH_2PO_4 ; 1,4 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6 g uree; 10 mg of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,8 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,2 mg of $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 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 și are următoarea compoziție: materie organică totală 22... 27,5 părți, din care celuloză 10 .. 12,5 părți, lignină 5...6,5 părți, acizi humici 2,5... 3,5 părți, chitină 1,5... 2 părți, substanțe azotate total 2,5 ... 3,5 părți, substanțe minerale totale (cenușă) 5 ... 7,5 părți, apa până la 100 părți, părțile fiind exprimate în greutate, iar numărul de propagule de *Trichoderma viride* Td₄₉ este mai mare de 1 million per gram de produs.
2. Tulpină antagonistă de *Trichoderma viride*, Td49, depozitată cu numărul (P) 001357 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*, *F. verticilloides*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia bataticola*, *Stemphylium radicinum*.