



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00256**

(22) Data de depozit: **22.03.2010**

(41) Data publicării cererii:
30.09.2011 BOPI nr. **9/2011**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ -
ICCF, CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **PAMFIL MARIA, STR. CPT. LICĂREȚ
NR.1, BL.33B, SC.4, AP.164, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MIHU GHICA, STR. MĂRĂȘEȘTI NR.98,
SC.C, AP.32, BACĂU, BC, RO;**

• **MOSCOVICI MIȘU, STR.JEAN STERIADI
NR.7, BL. I 22, SC.B, ET.2, AP.16,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SAVOIU VALERIA GABRIELA,
STR. MOISE NICOARĂ NR.41, BL.D3,
SC.C, AP.13, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **STEFANIU AMALIA, STR. MINIȘ NR.4,
BL.X6, SC.1, AP.114, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PODOSU CRISTESCU AURELIA,
STR. CONSTRUCTORULUI NR.2, BL. I 1,
SC.C, AP.4, FOCȘANI, VR, RO**

(54) **PRODUSE BIOLOGICE UTILIZATE PENTRU COMBATEREA
BACTERIOZELOR LA PLANTELE HORTIVITICOLE ÎN
AGRICULTURA ECOLOGICĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor produse biologice pe bază de tulpini de *Bacillus subtilis*, *Bacillus* pentru combaterea bacteriozelor plantelor, cuprinzând dezvoltarea preinoculului prin cultivarea sub agitare a tulpinilor pe un mediu de cultură conținând extract de porumb, ca sursă de factori de creștere și sursă slabă de carbon, săruri minerale și microelemente, la temperatura de 30...32°C, timp de 15...17 h, cultivarea în aceleași condiții a inoculului,

bioprosesarea pentru dezvoltarea și sporularea culturii bacteriene pe un mediu asemănător, dar îmbogățit în nutrienții respectivi, timp de 24...26 h, la 30...32°C, separarea biomasei de supernatant și uscarea prin atomizare a biomasei bacteriene, cu obținerea unui produs conținând un număr mare de spori liberi.

Revendicări: 1

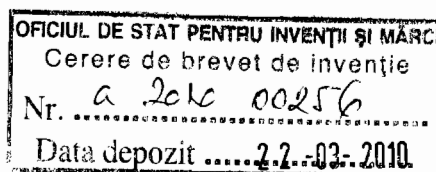
Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea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



Prezenta inventie se refera la un procedeu de obtinere a produselor biologice folosite in agricultura ecologica pentru combaterea bacteriozelor, utilizand culturi mixte de *Bacillus subtilis*. Bacteriozele plantelor, boli produse de bacterii patogene, trebuie sa fie depistate cat mai devreme, pentru a stopa extinderea lor si implicit, aparitia situatiilor in care combaterea acestora ar fi mult ingreunata sau chiar imposibila. Numarul de boli produse de bacterii este ridicat, multe dintre ele avand o mare importanta economica. Pierderile cauzate agriculturii mondiale de catre boli, buruieni si daunatori reprezinta 35-50% din productia anuala.

Metodele de prevenire si combatere a bacteriozelor plantelor sunt urmatoarele:

- cultivarea soiurilor si hibrizilor de plante rezistente sau tolerante fata de bacterii fitopatogene;
- metode fizico-chimice
- metode chimice
- metode biologice
- masuri de carantina fitosanitara



Metodele biologice, datorita avantajelor mari pe care le prezinta si anume: lipsa de toxicitate fata de animale si oameni, a fitotoxicitatii reduse si a caracterului nepoluant in apa si aer, urmeaza ca in viitor sa ocupe un loc mai important in combaterea bolilor plantelor.

Principalii agenti bacterieni fitopatogeni ai culturilor legumicole si vitei de vie sunt urmatorii: *Erwinia carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas lacrymans*.

Cercetarea a demonstrat in timp ca, filogenetic, unele microorganisme pot actiona ca antagonisti naturali pentru patogenii diverselor plante.

Microorganismele apartinand genurilor *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, etc, au fost folosite ca antagonisti microbieni in diferite tari mai ales in S.U.A. Dintre microorganismele descrise, *Bacillus subtilis* este una dintre speciile cu ponderea cea mai mare in utilizarea ca agenti de biocontrol pentru bacterioze. Plantele infectate cu bacterii patogene se pot trata folosind o tulpina sau o combinatie de doua tulpini de *Bacillus subtilis*, optional singure sau impreuna cu pesticide chimice in cantitate mica. Tulpinile de *Bacillus subtilis* folosite in biotehnologie pentru obtinerea de antagonisti microbieni ai unor bacterioze, au fost izolate si selectionate din natura – plante cerealiere uscate, plante medicinale, buruieni. Tulpinile s-au selectionat macroscopic dupa aspectul, marimea si culoarea coloniilor crescute pe mediul solid agarizat si microscopic dupa marimea bacililor, prezenta, forma si pozitia sporilor in celule in cazul bacteriilor sporogene gram + cum este *Bacillus subtilis*.

Tulpinile selectionate s-au caracterizat si biochimic privind capacitatea acestora de a metaboliza partial sau total diverse zaharuri.

Procedeu de obtinere prin biosinteza a produselor biologice antibacteriene conform inventiei consta in urmatoarele:

- faza de preinocul prin cultivarea sub agitare a tulpinilor de *Bacillus subtilis* pe un mediu care contine extract de porumb ca sursa de factori de crestere si sursa slaba de carbon, saruri minerale si microelemente. Dezvoltarea tulpinilor are loc la

temperatura de 30-32°C, timp de 15-17 ore.

- faza de inocul se desfasoara in aceleasi conditii ca preinoculul sau in bioreactoare de capacitate corespunzatoare volumului necesarului de inoculare.
- faza de bioproces, care consta in dezvoltarea si sporularea bacteriilor pe un mediu de cultura imbogatit in substante nutritive fata de preinocul si inocul, in conditii de agitare.
- faza de separare a biomasei de supernatant prin racire si/sau floclulare.
- faza de uscare prin atomizare la temperatura de 165-170°C (intrare) si 65-70 °C (iesire)

Avantajul inventiei consta in aceea ca produsele biologice obtinute cu *Bacillus subtilis* printr-o tehnologie originala previn si combat cu bune rezultate contaminarea cu bacterii patogene a plantelor hortiviticele.

Se prezinta in continuare un exemplu de realizare a inventiei:

a). Obtinerea preinoculului pe un mediu compus din urmatoarele ingrediente: extract de porumb 1.5 g (50% s.u.), azotat de amoniu sau sulfat de amoniu 0.1 g, clorura de calciu sicc 0.01g, sulfat de magneziu 0.05g, sulfat de mangan 0.001g, apa comuna ad. 100 ml, pH-ul se corecteaza la 6.5 – 6.7 cu solutie NaOH 40%; sterilizarea se efectueaza 30 minute la temperatura de 120°C. Mediul se insamanteaza cu o suspensie bacteriana formata din *Bacillus subtilis ICCF84* si *ICCF284* sau *Bacillus subtilis ICCF84* si *ICCF285* in apa distilata sterila. Dupa dezvoltare sub agitare la temperatura de 30 – 32°C, timp de 15-17 ore se obtine o cultura care contine in majoritate bacili simpli, rar sporulati si un numar mic de spori liberi. Cu preinoculul dezvoltat se insamanteaza mediul de inocul in proportie de 1-1.5 % v/v.

b). Inoculul se obtine in aceleasi conditii ca preinoculul la baloane agitate sau in bioreactoare daca bioprocesul se lucreaza la volume mari.

c). Faza de bioproces are loc in bioreactoare metalice de capacitate 150 L (80 L volum de lucru) cu urmatorul mediu de fermentatie: extract de porumb 3-3.5 g (50% s.u.), azotat de amoniu sau sulfat de amoniu 0.25 g, clorura de calciu sicc 0.01 g, sulfat de magneziu 0.05 g, sulfat de mangan 0.002 g, apa comuna ad. 100 ml, pH 6.5 – 6.7 cu solutie NaOH 40%, sterilizare 30 minute la 125°C. Dupa sterilizare si racire, mediul se insamanteaza cu inocul in proportie de 1 – 1.5 % v/v.

Parametrii optimi de lucru: temperatura 30-32°C, presiune 0.3 – 0.5 at, aerare 0.25 – 0.35 L / L med / min, agitare 250-300 rpm. Cand pH-ul culturii este peste 8 si sporularea peste 90%, bioprocesul se considera incheiat.

d). Separarea biomasei de supernatant are loc prin decantare sub racire si/sau cu adaos de adjuvant de separare (floclulant) cationit slab bazic sulfonat in proportie de 0.1 – 0.15 % v/v.

e). Uscarea biomasei se realizeaza prin atomizare la temperatura de 165 – 170°C intrare si 65 – 70°C iesire. Produsul finit se prezinta sub forma de pulbere bej-maronie nehigroscopica, cu gust si miros caracteristic, contine un numar mare de spori liberi de $2 \cdot 10^{10}$ – $3 \cdot 10^{12}$ ufc/g, proteine, aminoacizi esentiali, cantitati mici de lipide.

Sporii in proportie mare din biomasa bacteriana, sunt cei mai importanti,

intrucat contin enzime si lipopeptide cu rol antibiotic, care determina actiunea de antagonism microbial pentru bacteriozele care ataca plantele de cultura. Organismele ce reprezinta antagonisti microbieni secreta o gama larga de peptide antimicrobiene produse de sinteza ribozomala (protectori si bacteriocine) sau sinteze nonribozomale (cyclopeptide, pseudopeptide).

In afara de forma solida pulbere, se poate folosi cu bune rezultate si mediul final lichid sau numai supernatantul obtinut in urma bioprocesului dupa decantarea biomasei.

Produsele microbiene se folosesc prin dizolvare in apa in anumite proportii, cu preponderenta la tratarea semintelor, materialului saditor si la stropirea plantelor in primele faze de vegetatie.

Bibliografie

1. Rodgers - "Appl. Environ. Microbiol.", 1994, 60:2023-30
2. Leifert et al.- "Appl. Bacteriol.", 1995, 78:97-108
3. Lows F. J. - "Phytopathology", 1999, 37:81-125
4. Mathre, D.E.- "Plant Disease", 1999, 83:972-983
5. Cook, R.J. - "Phytopathology". 2000, 38:95-116
6. Paulitz, T.C. - "Phytopathology", 2001, 39:103-133
7. Vernescu S.V. - "Patogenii si daunatorii plantelor de cultura", 2004, 39-40
8. Severin V., Iliescu C.H. - "Bolile bacteriene ale plantelor", 2006, 89-93

Revendicare

Procedeu de obtinere a unor produse biologice utilizate pentru combaterea bacteriozelor, boli provocate de anumite bacterii patogene la plante, continand bacteriile *Bacillus subtilis ICCF84* si *ICCF284* sau *Bacillus subtilis ICCF84* si *ICCF285* in culturi mixte, tulpini izolate si selectate din natura – plante cerealiere uscate, plante medicinale si buruieni, caracterizat prin aceea ca acesta cuprinde fazelet de dezvoltare a preinoculului, - prin cultivarea sub agitare a tulpinilor, pe un mediu care contine extract de porumb ca sursa de factori de crestere si sursa slaba de carbon, saruri minerale, microelemente, la temperatura de 30-32°C timp de 15-17 ore, faza de inocul desfasurata in aceleasi conditii ca preinoculul, faza de bioproces pentru dezvoltarea si sporularea culturii bacteriene pe un mediu asemanator cu preinoculul si inoculul, dar imbogatit in nutrientii respectivi, timp de 24-26 ore cu sporulare de peste 92%, separarea prin racire si/sau floclare a biomasei de supernatant si uscarea prin atomizare a biomasei bacteriene; in final se obtine o pulbere bej maronie nehidrosopica cu gust si miros caracteristic care se aplica prin dizolvare in apa la semintele plantelor legumicole, la tratarea materialului saditor al vitei de vie sau la stropirea plantutelor tinere.