



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00238**

(22) Data de depozit: **16.03.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.11.2013** BOPI nr. **11/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.12.2011 BOPI nr. **12/2011**

(73) Titular:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **GHEORGHE AMALIA TATIANA, STR.VIZANȚEA NR.18, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **JECU MARIA-LUIZA, STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **RĂUT IULIANA, ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4, SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **VOICU ANCA, STR.GEORGE FOLESCU NR.26, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **LĂZĂROAIE MIHAELA MARILENA, STR.CRINULUI NR.20-24, BL.A 4, SC.A, ET.1, AP.7, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ROSEANU-CONSTANTINESCU ANCA MALINA, ȘOS.PANTELIMON NR.74, BL.411, SC.1, ET.9, AP.34, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CHELU FLORICA, DRUMUL TABEREI NR.90, BL.C 8, SC.A, ET.5, AP.19, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **FLORIAN PAULA, STR.VII TORULUI NR.199, BL.42 A, SC.1, ET.9, AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STOICA ANICUȚA, STR.BOBĂLNA NR.3 B, PLOIEȘTI, PH, RO;**
- **STROESCU MARTA, ȘOS.IANCULUI NR.29, BL.105 B, SC.B, ET.1, AP.65, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

JP 11246324 A; CN 101584346 A; CN 101423812 A

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PRODUS BACTERIAN CU ACTIVITATE ANTIFUNGICĂ**



RO 126895 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs bacterian cu activitate
antifungică, utilizabil în prevenirea creșterii și dezvoltării fungilor toxigenici și implicit în
3 inhibarea producerii de micotoxine.

Micotoxinele sunt metaboliți secundari produși de fungi filamentoși aparținând
5 speciilor de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* care contaminatează cerealele
și plantele de cultură.

7 Speciile de *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus*
amyloliquefaciens, *Bacillus licheniformis*) sunt cunoscute drept cele mai bune producătoare
9 de metaboliți care prin activitatea lor antifungică au un rol esențial în controlul biologic al
infecțiilor de la plante contaminate cu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* etc (**US 2009/**
11 **0214502 A1**, **US 6960342 B2**).

Se cunoaște **JP 11246324 (A)**, în care se prezintă obținerea unui produs bacterian
13 pe bază de *Bacillus amylolichefaciens*, prin metoda de centrifugare, care poate fi utilizat în
tratamentul culturilor de dud. Dezavantajul metodei constă în faptul că nu are o eliberare
15 controlată a compozitului, iar aplicarea sa se recomandă în special plantațiilor de dud.

CN 101584346 (A) prezintă o metodă de preparare a unui produs biologic împotriva
17 nematozilor, produsul rezultat fiind un pesticid microbial. Metoda de preparare constă din
cultivarea unei tulpini de *Bacillus amylolichefaciens*, pe un mediu cu extract de carne de vită,
19 pulbere de peptonă, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ și NaCl, produsul având un pH cuprins între 6,5 și 8.
Dezavantajul acestei metode constă în valorile de pH ușor alcaline și în acțiunea
21 distrugătoare eficientă asupra nematodelor plantelor precum: *Bursaphelenchus xylophilus*,
Radopholus similis, *Aphelenchoides besseyi*.

CN 101423812 (A), prezintă un agent antimicrobial care cuprinde 82-95 părți de
23 mediu de fermentare a bacilului *Bacillus amylolichefaciens*, 2-8 părți agent tensioactiv și 1-4
părți de conservant. Metoda prezentată are dezavantajul că nu oferă o eliberare controlată
25 a agentului antimicrobial.

În majoritatea cazurilor, metaboliții secretați sunt polipeptide care conferă o rezistență
27 crescută față de acțiunea hidrolitică a unor enzime proteolitice (**Haggag, W., M. și Abdel-**
Latif A. M., H., 2007, Biotechnological aspects of microorganisms used in plant
29 **biological control, World J. Agric. Sci., 3 (6), 771-776**).

Datorită efectelor mutagene, cancerigene, imunosupresoare, consumul de alimente
31 infestate cu micotoxine prezintă un risc major pentru sănătatea omului și animalelor
domestice (**Sweeney, M, J. și Dobson, A. D. W., 1998, Mycotoxin production by**
33 ***Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, Internat. J. Food Microbiol., 43, 141-**
35 **158; Cary, J. W., Calvo, A. M., 2008, Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis,**
Toxin Rev., 27, 4, 347 - 370). Cele mai importante micotoxine sunt aflatoxinele, ocratoxina
37 A, citrinina, fumonizina. Ochratoxina A este un metabolit produs de speciile de *Aspergillus*
și *Penicillium*. Prezenta ei a fost detectată în cereale, cafea, fructe uscate, bere, vin. Citrinina
39 este produsă de numeroase specii de *Penicillium* și contaminatează culturi de grau, orz, ovăz,
orez și porumb. Ingerate zilnic prin alimente contaminate ambele micotoxine au efecte
41 nefrotoxice.

Impactul asupra stării de sănătate a populației și economiei au condus la elaborarea
43 unor strategii pentru eliminarea și/sau reducerea producerii de micotoxine și implicit a
efectelor lor toxice. Dintre acestea, controlul biologic bazat pe antagonismul patogen - agent
45 biologic de origine microbială reprezintă o alternativă la procedeele care utilizează agenți
chimici poluanți.

RO 126895 B1

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este aceea de combatere a efectelor produse de patogeni la plante, cereale etc.	1
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs bacterian cu activitate antifungică, cu microorganismul <i>Bacillus amylolichefaciens</i> . Procedeu cuprinde fazele de: dezvoltarea inoculului, cu un pH de 5,6-5,8, prin cultivarea tulpinii microbiene pe un mediu ce conține glucoză și săruri minerale: 0,9% peptone, 3,7% glucoză, până la 100% apă distilată, luate în procente de masă, la temperatura de 28 - 32°C, timp de 24 - 36 h; cultivarea pe un mediu ce conține glucoză și săruri minerale, la temperatura de 28 - 32°C, timp de 72 - 120 h și agitare la 160 - 200 rpm; separarea biomasei prin centrifugare și reținerea supernatantului; ajustarea pH-ului la valoarea de 2,5 - 3,5; extracția cu acetat de etil, în raport supernatant:solvent de 1:2,5 vol/vol; re-extracția stratului apos cu acetat de etil, în raport supernatant apos:solvent de 1:2,5 vol/vol; reunirea extractelor și evaporarea solventului la 40°C, timp de 20 - 30 min; solubilizarea depozitului în apă distilată sterilă; condiționarea metaboliților microbieni sub formă de emulsie în ulei de floarea soarelui și lecitină vegetală drept agent tensioactiv, soluția de metabolit bacterian fiind sterilizată la 110°C, timp de 20 min sau condiționarea metaboliților microbieni sub formă de emulsie prin încapsulare în particule de polimer natural, emulsia cu activitate biocidă obținându-se prin amestecarea componentelor cu un agitator mecanic cu turația de 1000 rpm, timp de 10-20 min, proporția componentelor în emulsie fiind de: 76,5% ulei de floarea soarelui, 21% supernatant sterilizat și 2,5% lecitină vegetală.	3 5 7 9 11 13 15 17 19
Prezenta invenție oferă următoarele avantaje:	21
- reducerea/inlocuirea produselor chimice, în general toxice;	
- reducerea poluării apelor și solului produsă prin utilizarea fungicidelor chimice;	23
- eliberare controlată și stabilitate mărită asigurată prin condiționarea produsului microbial;	25
- procedeul de obținere este fezabil și nu necesită aparatură foarte complexă.	
Produsul microbial condiționat este eficient în inhibarea creșterii microbiene și producerii de micotoxine de către tulpinile de fungi filamentoși.	27
Stabilitatea și eficiența produsului microbial sunt asigurate prin condiționarea sa sub formă de emulsie sau prin încapsulare în polimeri naturali, ce oferă o protecție împotriva degradării compusului activ.	29 31
Se prezintă în continuare două exemple de realizare a invenției:	
Exemplul 1.	33
1. Obținerea inoculului dintr-un mediu compus din următoarele ingrediente: peptonă 10 g, glucoză 40 g, apă distilată 1000 ml, pH = 5,6 - 5,8.	35
Mediul de cultura se inoculează cu o suspensie de <i>Bacillus amylolichefaciens</i> în apă distilată sterilă. Cultura obținută după incubare la temperatura de 28 - 32°C, timp de 24 - 36 h, sub agitare de 160-200 rpm reprezintă cultura inocul.	37
2. Obținerea culturii de bioproces pe un mediu compus din următoarele ingrediente: peptonă 10 g, glucoză 40 g, apă distilată 1000 ml, pH = 5,6 - 5,8. Inoculul mediului de bioproces a fost de 10%. Cultura se menține la temperatura de 28 - 32°C, timp de 72 - 120 h, sub agitare de 160 - 200 rpm, în baloane Erlenmayer de 300 ml în care s-au repartizat 200 ml de mediu.	39 41 43
3. Separarea biomasei bacteriene prin centrifugare la 4000 rpm și 4°C și îndepărtarea depozitului.	45
4. Ajustarea pH-ului supernatantului la valoarea de 2,5 - 3,5.	
5. Extracția cu acetat de etil, în raport supernatant: solvent de 1:2.5 vol/vol. Reținerea stratului organic.	47

RO 126895 B1

1 6. Re-extracția stratului apos cu acetat de etil, în raport supernatant apos : solvent
de 1 : 2,5 vol/vol.

3 7. Reunirea celor două extracte în solvent organic și evaporare solvent la
temperatura de 40°C, timp de 20 - 30 min.

5 8. Solubilizarea depozitului de culoare maro-galbuli obținut de la evaporare în apă
distilată sterilă.

7 9. Condiționarea sub formă de emulsie în ulei de floarea soarelui și lecitină vegetală
drept agent tensioactiv. Soluția de metabolit bacterian a fost sterilizată la 110°C, timp de 20
9 min. Emulsia cu activitate biocidă s-a obținut prin amestecarea componentelor cu un agitator
mecanic cu turație de 1000 rpm, timp de 10 - 20 min. Proporția componentelor în emulsie
11 a fost următoarea: 16 ml de ulei de floarea soarelui, 4 ml supernatant sterilizat și 0,5 g
lecitină vegetală.

13 Produsul astfel condiționat are activitate antifungică manifestată față de tulpini de
Aspergillus niger și *Penicillium* sp. Testarea activității antifungice a fost realizată prin
15 urmărirea efectului produsului bacterian asupra unor culturi fungice dezvoltate pe mediu solid
și lichid. Testarea activității antifungice pe mediu solid s-a realizat prin metoda difuziei în
17 agar. Zonele de inhibiție ale creșterii fungice au fost măsurate și activitatea antifungică a fost
exprimată prin diferența dintre diametrul zonei de inhibiție și diametrul coloniei bacteriene.
19 În culturile lichide, biomasa fungică obținută de la culturile de *Aspergillus niger* și *Penicillium*
sp. tratate cu soluție de metaboliți bacterieni a fost inhibată în proporție de 75 - 89%, iar
21 producerea de ochratoxină A și cea de citrinină a fost inhibată în proporție de 65 - 92%.
Determinarea micotoxinelor s-a efectuat prin metoda ELISA, folosind kit-uri specifice
23 RidaScreen (R-BiopHarm AG, Darmstadt, Germania).

25 Efectul inhibitor al supernatantelor de la cultura bacteriană asupra tulpinilor fungice
a fost pus în evidență prin teste specifice biochimice. Astfel s-a demonstrat la nivel calitativ
27 producerea de enzime din categoria proteazelor (lichefierea gelatinei urmărită prin metoda
Frazier, tehnica filmului fotografic și hidroliza gelatinei), celulazelor (metoda cu hârtie
Whatman), reductazelor (reducerea colorantului albastru de metilen și reducerea nitraților
29 din mediu la nitriți), oxidazelor (acțiunea asupra diclor tetra metil-p-fenilendiamina),
catalazelor (acțiunea asupra apei oxigenate), producerea unor metaboliți toxici pentru alte
31 microorganisme de tipul H₂S și a amoniacului, producerea de pigmenți difuzibili cu rol
inhibitor (siderofori). Intensitatea reacției de răspuns la aceste teste este un indiciu al
33 activității antifungice a produsului microbian.

Exemplul 2.

35 1. Obținerea inoculului dintr-un mediu compus din următoarele ingrediente: peptonă
10 g, glucoză 40 g, apă distilată 1000 ml, pH = 5,6 - 5,8. Mediul de cultură se inoculează cu
37 o suspensie de *Bacillus amylolichefaciens* în apă distilată sterilă. Cultura obținută după
incubare la temperatura de 28 - 32°C, timp de 24 - 36 h, sub agitare de 160 - 200 rpm
39 reprezintă cultura inocul.

41 2. Obținerea culturii de bioproces pe un mediu compus din următoarele ingrediente:
peptonă 10 g, glucoză 40 g, apă distilată 1000 ml, pH = 5,6 - 5,8. Inoculul mediului de
bioproces a fost de 10%. Cultura se menține la temperatura de 28 - 32°C, timp de 72 - 120 h,
43 sub agitare de 160 - 200 rpm, în baloane Erlenmayer de 300 ml în care s-au repartizat 200
ml de mediu.

45 3. Separarea biomasei bacteriene prin centrifugare la 4000 rpm și 4°C și îndepărtarea
depozitului.

47 4. Ajustarea pH-ului supernatantului la valoarea de 2,5 - 3,5.

49 5. Extracția cu acetat de etil, în raport supernatant: solvent de 1:2.5 vol/vol. Reținerea
stratului organic.

RO 126895 B1

6. Re-extracția stratului apos cu acetat de etil, în raport supernatant apos : solvent de 1 : 2,5 vol/vol. 1
7. Reunirea celor două extracte în solvent organic și evaporare solvent la temperatura de 40°C, timp de 20 - 30 min. 3
8. Solubilizarea depozitului de culoare maro-gălbui obținut de la evaporare în apă distilată sterilă. 5
9. Condiționarea supernatantului microbial prin încapsulare în polimeri naturali (agar). Concentrația de metaboliți microbieni a fost de 15% în soluția de agar 2%. Capsulele de agar s-au obținut prin picurarea soluțiilor de agar - metaboliți microbieni în ulei vegetal (de floarea soarelui) cu ajutorul unei seringi. Diametrul mediu al capsulelor obținute a fost de 2,5 mm. 7
9
11
- Produsul bacterian astfel condiționat are activitate antifungică manifestată față de tulpini de *Aspergillus niger* și *Penicillium* sp. Testarea activității antifungice a fost realizată prin urmărirea efectului produsului bacterian asupra unor culturi fungice pe mediu lichid. În prezența metaboliților bacterieni cantitatea de biomasă fungică obținută de la culturile de *Aspergillus niger* și *Penicillium* sp. a fost redusă în proporție de 60 - 85%, iar producerea de ochratoxină și cea de citrinină au fost inhibitate în proporție de 53 - 92%. Determinarea micotoxinelor s-a efectuat prin metoda ELISA, folosind kit-uri specifice RedaScreen. 13
15
17

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a unui produs bacterian cu activitate antifungică față de fungi filamentoși precum *Aspergillus* sp. și *Penicillium* sp. din cultură de *Bacillus amylolichefaciens*, caracterizat prin aceea că acesta constă din următoarele etape: dezvoltarea inoculului, cu un pH de 5,6...5,8, prin cultivarea tulpinii microbiene pe un mediu ce conține glucoză și săruri minerale: 0,9% peptone, 3,7% glucoză, până la 100% apă distilată, luate în procente de masă, la temperatura de 28...32°C, timp de 24...36 h; cultivarea pe un mediu ce conține glucoză și săruri minerale, la temperatura de 28...32°C, timp de 72...120 h și agitare la 160...200 rpm; separarea biomasei prin centrifugare și reținerea supernatantului; ajustarea pH-ului la valoarea de 2,5...3,5; extracția cu acetat de etil, în raport supernatant:solvent de 1:2,5 vol/vol; re-extracția stratului apos cu acetat de etil, în raport supernatant apos:solvent de 1:2,5 vol/vol; reunirea extractelor și evaporarea solventului la 40°C, timp de 20...30 min; solubilizarea depozitului în apă distilată sterilă; condiționarea metaboliților microbieni sub formă de emulsie în ulei de floarea soarelui și lecitină vegetală drept agent tensioactiv, soluția de metabolit bacterian fiind sterilizată la 110°C, timp de 20 min, sau condiționarea metaboliților microbieni sub formă de emulsie prin încapsulare în particule de polimer natural, emulsia cu activitate biocidă obținându-se prin amestecarea componentelor cu un agitator mecanic cu turația de 1000 rpm, timp de 10...20 min, proporția componentelor în emulsie fiind de: 76,5% ulei de floarea soarelui, 21% supernatant sterilizat și 2,5% lecitină vegetală.

21



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 1092/2013