



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01205

(22) Data de depozit: 23.11.2011

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPi nr. 9/2012

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

(72) Inventatori:
• ANDREI ANA-MARIA, STR. PORUMBACU
NR.9, BL.31, SC.1, ET.4, AP.29, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• FĂTU ANA CRISTINA,
STR. TUDOR VLADIMIRESCU BL.D9, AP.6,
MOINEȘTI, BC, RO;
• FĂTU VIOREL, COMUNA GRIVIȚA, IL, RO;
• FICIU LIDIA, STR. VALEA STĂLPULUI
NR. 96, SAT OLTENI, TEIȘANI, PH, RO;
• GHEORGHE MARIA, STR. NICOVANI
NR. 25, VALEA CĂLUGĂREASCA, PH, RO;
• CAZACU SILVIA, STR. CALEA POIENII
NR. 30, VALEA CĂLUGĂREASCĂ, PH, RO

(54) **FERTILIZANȚI ORGANICI ÎMBOGĂȚIȚI MICROBIOLOGIC
PENTRU PREVENIREA INFESTĂRII CU FILOXERĂ A
CULTURILOR VITICOLE**

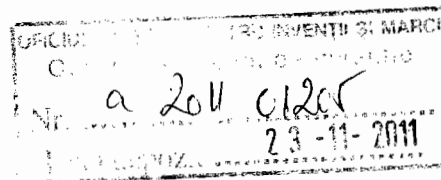
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru obținerea microbiologică a unor fertilizanți organici pentru vița de vie, prin selectarea agenților de control biologic, constând din *Beauveria bassiana* și *B. brongniartii*, obținerea culturilor fungice inocul, în fază de miceliu vegetativ, pre-sporulat, în mediu pe bază de glucoză, extract de porumb și săruri, obținerea biomasei inoculante prin înșămânțarea miceliului pe

substrat nutritiv până la sporulare, sterilizarea fertilizatorului constând din mranită și compost, realizarea amestecurilor de fertilizatori organici și biomasă fungică, și incubarea amestecurilor pentru creștere și sporulare fungică.

Revendicări: 4
Figuri: 4





9

FERTILIZANTI ORGANICI IMBOGATITI MICROBIOLOGIC PENTRU PREVENIREA INFESTARII CU FILOXERA A CULTURILOR VITICOLE

DESCRIEREA INVENTIEI

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui biopreparat cu efect fertilizant, insecticid si de crestere a potentialului represiv al solului fata de filoxeră, obtinut prin inocularea unor tulpini selectate de microorganisme entomopatogene (*Beauveria bassiana* si *B. brongniartii*) în mranita si compost - fertilizanti naturali, bogati în substante organice si minerale. *Beauveria bassiana* si *B. brongniartii* sunt fungi entomopatogeni al caror habitat de origine este solul si care se utilizeaza la scara comerciala pentru obtinerea de bioinsecticide. Utilizarea mranitei si a compostului ca substrat nutritiv pentru tulpinile de *Beauveria* este justificata de faptul ca, având origine apropiată de vișele sălbatice, culturile de portaltoi pentru viticultură produc mari cantități de material vegetal, ceea ce face necesara asigurarea unui agrofond superior, prin administrare de nutrienți în sol, sub formă de îngrășăminte organice.

Rezultate semnificative în acest domeniu se refera la dezvoltarea unor fertilizanti biologici de interes agricol care utilizeaza microorganisme bacteriene sau fungice ca *inoculanti microbieni* sau *inoculanti de sol*; acestea sporesc proprietatile biologice ale solului si au efect direct asupra plantelor, stimulând cresterea acestora, favorizând dezvoltarea sanatoasa a sistemului radicular, îmbunatatind rezistenta la stress, marind astfel capacitatea de aparare împotriva atacurilor agentilor de daunare. In Grecia a fost descrisa o metoda de obtinere a unui fertilizant organic pentru culturile de maslin, vita de vie si cartof, constând în procesarea biologica a deseurilor lichide provenite din prelucrarea maslinelor, utilizate ca substrat pentru cultivarea unor bacterii fixatoare de azot (*Azotobacter vinelandii*) [1]. In Taiwan, a fost descris procedeu de obtinere a unui fertilizant biologic pe baza de bacterii lipolitice (*Brevibacillus borstelensis*) [2]. In Egipt, a fost descris procedeu de îmbogățire microbiologica a unor fertilizanti (Rice Straw Composting) prin inocularea unor actinomicete din genurile *Micromonospora*, *Streptomyces* si *Nocardiodetes* [3]. Sunt deasemenea prezentate rezultate privind rolul unor amestecuri formate din produse de fertilizare si agenti de control biologic (*Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*) în protectia culturilor de ceapa fata de atacul unor daunatori [8]. In Pakistan s-au publicat rezultate privind eficacitatea în combaterea moliei *Phthorimaea operculella* a unor amestecuri de fertilizanti cu microorganisme entomopatogene (*Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) [7]. Diferiti fungi inoculanti au fost studiati pentru efectul lor benefic asupra nutritiei plantelor [4]. Un procedeu original de inoculare a unei tulpini de *Beauveria bassiana* în locurile de hibernare ale daunatorului *Stelidota geminata* a fost descris de Patrick & Fernando (1997) [5]. Alte rezultate în acest domeniu au fost sintetizate în *Handbook of microbial biofertilizers* [6] (M.K. Ray, ed.).

Prezentam rezultate brevetate în acest domeniu : *Method and apparatus for producing organic fertiliser with the use of nitrogen fixing Bacillus (US 5071462/1991)*, *Biological inoculant effective against Aphanomyces (US 5244658/1993)*, *Produit d'addition biologique pour fertilisants organomineraux (WIPO*

WO2001032587/2001), *Plant growing media* (**US 6645267/2003**), *Soil conditioner and slow release bio-pesticidal and fertilizer composition* (**US 6596324/2003**), *Biological addition to organic-mineral fertilizers* (**US 6939688B1/2005**), *Mycocontractants and mycopesticides* (**US 7122176 B2/2006**), *Procedeu de obtinere a biopreparatelor agroinoculante cu bacterii în stare de dormanta* (**RO 123144 B1/2009**).

Biopreparatele si compozitiile fertilizante descrise au dezavantajul de a avea un spectru restrâns de aplicabilitate, fiind specifice numai anumitor culturi si/sau agenti de daunare. In nici unul din studiile/brevetele prezentate, substanta biologic activa, de origine bacteriana sau fungica, nu a fost experimentata pentru sporirea caracterului represiv al solului fata de colonizarea filoxerei. Produsele testate ca biofertilizanti rezulta adesea din activitati agricole sau industriale cu specific local (ex. compost de banane, deseuri lichide provenite din prelucrarea maslinelor etc).

Prezenta inventie constituie o premieră nationala în domeniul tehnologiilor nepoluante de obtinere a butasilor de vita de vie si are urmatoarele avantaje:

- propune un procedeu simplu, necostisitor de sporire a potentialului biologic al unor îngrasaminte naturale, procedeu a carui aplicare la scara mare nu necesita forta de munca cu calificare înalta;
- ofera o solutie aplicabila la scara comerciala, de eficientizare a procesului de obtinere a biomasei fungice biologic active, prin exploatarea caracterului microciclic al sporogenezei tulpinilor de *Beauveria*, în sensul obtinerii unor productii mari de spori (conidii) în timp scurt;
- ofera o solutie de eficientizare ecologica a mijloacelor biologice de protectie a culturilor viticole, prin utilizarea unor tulpini autohtone de *Beauveria*, cu potential bio-ecologic adaptat conditiilor pedo-climatiche din România, cu cerinte nutritionale simple, cu capacitatea de a degrada substratul nutritiv reprezentat de mranita si compost;
- ofera un mijloc ecologic de prevenire a infestarii cu filoxera, cel mai periculos daunator al vitei de vie, contribuind la diminuarea reziduurilor de pesticide si de poluanti din sol si din pâzna de apa freatica;
- contribuie la obtinerea unui material viticol saditor de calitate biologica si fitosanitara superioara.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia are la bază principiul agriculturii ecologice privind valorificarea resurselor naturale (microorganisme izolate din focare naturale de infectie) si se refera la dezvoltarea unui produs ecologic, care reduce substantial riscul de contaminare cu filoxeră, prin sporirea fertilității și activității biologice a solurilor din culturile viticole, folosind tulpini autohtone de *Beauveria bassiana* si *B. brongniartii*.

Procedeu constă în inocularea unor produse organice de fertilizare a culturilor viticole, respectiv mranita si compostul, cu biomasa fungica rezultata prin cresterea tulpinilor de *Beauveria bassiana* si *B. brongniartii* pe boabe de orz. Verificarea si demonstrarea functionalitatii acestui procedeu s-a facut (1) în conditii de laborator, pentru evaluarea masurii în care agentii de control biologic care au colonizat substratul nutritiv reprezentat de fertilizanti organici, si-au mentinut potentialul biologic si valentele ecologice si (2) în conditii de sera, pentru evaluarea efectului represiv al solului amendat cu fertilizanti organici îmbogătiți

microbiologic asupra filoxerei, precum si a efectului de stimulare a sistemului radicular al plantelor de vita de vie.

Prezentam 5 exemple de realizare a inventiei:

Exemplul 1

Selectarea sursei de material biologic pentru îmbogățirea microbiologica a fertilizantilor organici

S-au facut izolari monosporale, pornind de la culturi sporulate de *Beauveria bassiana* si *Beauveria brongniartii*. Cantități mici de conidii prelevate de pe mediu agarizat au fost dispersate în 20 ml apă sterila (+0,01% Tween 80) si s-au înșămânțat în cutii Petri, pe mediu cartof-glucoza-agar în 3 striuri paralele; conidiile localizate microscopic au fost transferate cu mediul suport în alt vas de cultura. După purificare, s-a evaluat capacitatea de multiplicare si sporulare în mediu de cultura lichid, precum si virulenta izolatelor prin metoda biotestarii (insecta test *Plodia interpunctella*).

Exemplul 2

Obținerea biomasei fungice inoculante

Având în vedere faptul ca microorganismele entomopatogene fungice au un ciclu biologic bifazic, respectiv faza de miceliu vegetativ si faza reproductiva, multiplicarea izolatelor fungice monosporale în vederea obtinerii biomasei fungice inoculante s-a facut în doua etape :

- obtinerea miceliului vegetativ (inocul fungic lichid), pornind de la colonii pure microbiologic înșămânțate pe mediu agarizat, incubate la 25°C, până la sporulare completa si transferate apoi într-un mediu de cultura lichid pe baza de glucoza, extract de porumb si saruri (NaNO₃, MgSO₄ KH₂PO₄). Mediul lichid a fost repartizat în vase de fermentatie, acoperite cu capisoane de vata si tifon si incubat, în conditii de agitare mecanica, 24 ore, la 27°C.

- obtinerea sporilor (conidii) fungici (biomasa fungica inoculanta) pe mediu de cultura solid reprezentat de boabe de orz. S-a procedat astfel: boabele de orz s-au cântărit, s-au spalat sub jet de apa si s-au repartizat în pungi de plastic autoclavabile; după sterilizare (121°C, 30 min.), pungile cu substrat nutritiv au fost inoculate cu 1,6 % inocul microbial lichid obtinut în etapa precedenta; substratul nutritiv inoculat a fost apoi incubat în conditii stationare, la 25°C, timp de 28 zile. Continutul în substanta activa a biomasei obtinute la sfârșitul perioadei de cultivare a fost de min. 6x10¹⁰ conidii/g.

Exemplul 3

Evaluarea compatibilitatii biologice dintre fertilizantii organici (mranita, compost) si tulpinile selectate de *B. bassiana* si *B. brongniartii*

S-au parcurs urmatoarele etape:

- obtinerea biomasei fungice inoculante, prin cultivare pe substrat organic nutritiv, până la

sporulare completa;

- sterilizarea mranitei si a compostului în pungi autoclavabile (2 ore, 1,2 atm.);
- realizarea amestecurilor dintre biomasa fungica si fertilizantii organici mranita si compost :

I. compost / biomasa fungica *B.bassiana*; II. compost / biomasa fungica *B.brongniartii*; III. mranita / biomasa fungica *B.bassiana*; IV. mranita / biomasa fungica *B.brongniartii*;

- incubarea amestecurilor de testat în incubator termostatat pentru microbiologie (SANYO Mir-162), la 25 °C, timp de 10 zile pentru cresterea si sporularea fungica;

- examinarea la lupa binocular a amestecurilor test, pentru evaluarea modului de dezvoltare saprofita a tulpinilor fungice, precum si a masurii în care se face raspândirea patogenului;

- cuantificarea sporilor fungici din amestecurile experimentale;

- examinarea în culturi artificiale a materialului biologic pentru evaluarea influentei produselor organice de fertilizare asupra unor parametri biologici ai agentilor microbieni inoculanti. Tulpinile fungice au fost reizolate din substraturile organice pe care le-au colonizat si inoculate pe mediu cartof-glucoza-agar (CGA). S-au facut masuratori privind cresterea radiala a coloniilor fungice, alegându-se randomizat câte 10 colonii/variante. Pentru cuantificarea productiei de spori s-au folosit discuri de hârtie de filtru umectate cu apa sterila, presate usor pe suprafata a câte 10 colonii fungice/variante, alese randomizat. Fiecare disc a fost plasat individual în câte o eprubeta continând câte 10 ml apa distilata sterila, cu emulgator Tween 80 (0.02%); eprubetele au fost plasate pe Vortex Mixer (1200 rpm), pentru eliberarea totala a conidiilor. S-au facut dilutii succesive din suspensiile astfel obtinute pentru determinarea hematocitometrica a conidiilor. In mod similar s-a procedat pentru evaluarea variantelor martor, reprezentate de culturi fungice, conservate pe mediu de cultura agarizat, fara sa fi fost supuse pasajului prin alte substraturi nutritive. Pentru testul de viabilitate câte 0,5 ml de suspensie conidiana s-au însamântat pe mediu agarizat. Cuantificarea viabilitatii (germinatie %) s-a facut dupa o perioada de incubare de 24 ore (25 ± 1°C). Pentru testul de virulenta suspensiile de conidii cu titru cunoscut au fost aplicate pe larve de *P. interpunctella*, utilizate ca insecta test; dupa 2 ore de contact cu patogenul, larvele au fost plasate pe mediu de crestere. S-au facut observatii de mortalitate larvara dupa 3-5 zile; au fost luate în considerare pentru calcularea procentului de mortalitate numai larvele acoperite cu miceliu fungic. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Examinarea culturilor pe substrat nutritiv etalon a evidentiat rate de crestere vegetativa si sporulare care se înscriu în parametrii normali de dezvoltare pe mediu sintetic. Comparativ cu varianta *etalon*, substratul nutritiv reprezentat de mranita a asigurat o rata medie zilnica de crestere de 1,05 x mai mare pentru tulpina de *B. bassiana*, respectiv de 1,07 x mai mare pentru tulpina de *B.brongniartii*. Conidiogeneza, viabilitatea si virulenta conidiilor nu au fost influentate negativ de substratul nutritiv. Productiile de conidii/g substrat (8,6-11,1 conidii $\times 10^{10}$) au fost mari, garantând un inocul patogen însemnat cantitativ. Estimarea viabilitatii conidiilor a evidentiat un procent mediu de germinare a conidiilor > 98%, cu o valoare maxima (100%) în cazul conidiilor de *B. brongniartii* izolate din mranita si o valoare minima (97%)

În cazul conidiilor de *B. bassiana* izolate din compost. Virulenta conidiilor izolate din mranita si compost nu a fost afectata de interactiunea cu produsele organice de fertilizare.

Tabelul 1

Parametrii biologici ai tulpinilor de *B. bassiana* si *B. brongniartii*, dupa reizolare din fertilizanti organici utilizati ca substraturi nutritive pentru multiplicare fungica

Tulpina fungica	Crestere vegetativa / CGA (dupa 15 zile de la însamântare)		Conidiogeneza (nr. conidiix10 ¹⁰ /g)	Viabilitate (germinatie %)	Virulenta (%)mortalitate <i>P. interpunctella</i>
	dimensiuni medii colonii	rata medie zilnica de crestere			
Substrat nutritiv : compost					
<i>B.bassiana</i>	5,7	0,32	8,6	97	91
<i>B. brongniartii</i>	3,7	0,24	11,1	99	89
Substrat nutritiv: mranita					
<i>B.bassiana</i>	6,1	0,4	9,2	99	92
<i>B. brongniartii</i>	3,9	0,28	10,9	100	87
Substrat nutritiv etalon: mediu de cultura sintetic (peptona-dextroza-agar)					
<i>B.bassiana</i>	5,9	0,38	2,9 (x10 ¹⁰ /cm ²)	100	100
<i>B. brongniartii</i>	3,9	0,26	2,4 (x10 ¹⁰ /cm ²)	100	92

Exemplul 4

Evaluarea capacitatii de colonizare a substratului organic de catre tulpinile fungice

Biomasa fungica a fost însamântata în substraturile organice reprezentate de mranita si compost în proportie de 1,5%. Incepând cu a 15-a zi de incubare la temperatura de 22°C-24°C, (fotofaza 10 ore lumina/14 ore întuneric) s-au facut observatii privind capacitatea de colonizare a substratului organic de catre tulpinile fungice (crestere miceliana, sporogeneza) : s-a amestecat 1g substrat test + 200 ml apa sterila timp de 15 minute; suspensiile obtinute dupa 10 min. de decantare au fost însamântate pe mediu agarizat în cutii Petri (dilutie 10⁻⁵). Dupa 48 ore de incubare (25°C) s-au numarat unitatile formatoare de colonii, utilizând numarator de colonii prevazut cu marker electric automat si lupă cu putere de mărire 2x. S-a constatat ca dupa 15-18 zile de la inoculare, substraturile nutritive reprezentate de mranita si compost au fost colonizate abundant de tulpinile fungice în proportie de >75%, fiind identificate hife miceliene atât la suprafata substratului, cât si în adâncime. Numarul de unitati formatoare de colonii a variat între 1,1x10² - 1,5x10³ ufc/g, ceea ce demonstreaza faptul ca mranita si compostul au fost exploatate în mod eficient ca substrat nutritiv, care a asigurat cresterea, raspândirea si sporularea fungica (fig. 1).

Exemplul 5

Evaluarea potențialului represiv al solurilor amendate cu fertilizanti organici îmbogătit microbiologic

Experimentele s-au desfasurat în conditii de sera pe soiuri de *Vitis vinifera* cu rezistență diferită la filoxeră: Merlot (foarte sensibil), Purpuriu (slab rezistent) și R 10 (rezistent), folosind butași din coarde de un an, forțați timp de 4 luni în serele de forțare, apoi plantati în ghivece cu capacitatea de 6 l (câte 5 ghivece pentru fiecare varianta) si continând pământ de țelină amendat cu mranita îmbogătit

microbiologic, respectiv cu compost îmbogățite microbiologic, în proporție de 1,5% biomasa fungică obținută prin cultivarea tulpinilor de *B. bassiana*, respectiv *B. brongniartii*, pe boabe de orz. În varianta martor s-a folosit pământ de telina neamendat cu produse de fertilizare. Ghivecele conținând amestecurile experimentale au fost așezate în seră, în condiții optime pentru înrădăcinare și creștere. Plantele au fost infestate artificial cu filoxera, prin „metoda alipirii” cu frunze recoltate de la butuci de portocali atacați de filoxera galicola. Pentru determinarea gradului de răspândire în sol a tulpinilor fungice, s-a făcut analiza microbiologică a solului; pentru aceasta, pe parcursul a 6 luni, s-au prelevat probe de la 2 și 10 cm adâncime, din trei puncte diferite; probele s-au lăsat la uscat, la temperatura de 25°C, timp de 24 de ore, apoi s-au omogenizat și cântărit câte 1 gram/proba. Sistemul radicular al butasilor a fost analizat microscopic pentru determinarea aspectului radacinilor, dimensiunii și numărului de nodozități, precum și a numărului de gale, ca indicator al nivelului de intensitate al atacului produs de filoxeră. S-a constatat faptul că aportul de materie organică îmbogățită microbiologic a favorizat dezvoltarea abundentă a sistemului radicular al butasilor, precum și diminuarea efectelor produse de filoxera galicola cu procente cuprinse între 18-30%.

1. Chatjipavlidis, I., M. Antonakou, D. Demou, F. Flouri and C. Balis – 1996. Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plant in Messinia, Greece. Volume 38, Issues 3-4, 183-187.
2. Shu-Hsien Tsai, Ching-Piao Liu, Shang-Shyng Yang- 2007. Microbial conversion of food wastes for biofertilizer production with thermophilic lipolytic microbes. Renewable Energy. Volume 32, Issue 6, 904-915.
3. Hesham M. Abdulla – 2007. Enhancement of Rice Straw Composting by Lignocellulolytic Actinomycete Strains. International Journal Of Agriculture & Biology, 106–109 .
4. Marschner, P., Timonen, S.- 2004. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology* 28: 23–36.
5. Patrick, D., Fernando, V. (1997). Autoinoculative Dispersal of Bioactive Agents by Sap Beetles (Technical Abstract). National Entomological Society of America Annual Meeting.
6. Ray, M.K. – 2006. *Handbook of microbial biofertilizers, 2006*. (M.K. Ray, ed.)
7. Sabbour, M.M. – 2006. Effect of some fertilizers mixed with bioinsecticides on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* infesting potato in the field and store. Pak. J. Biol. Sci., 9 (10): 1929-1934.
8. Sabbour, M.M., Abbass, M.H. - 2006. The role of some bioagent mixed with some fertilizers for the control onion pests. Journal of Applied Sciences research, 2 (9): 624-628

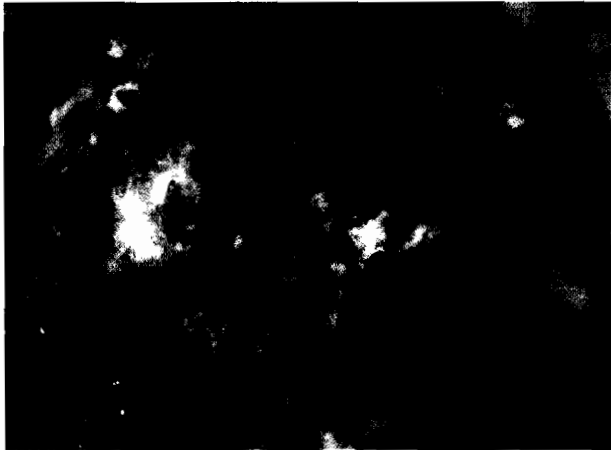
Revendicari

1. Procedeu de îmbogățire microbiologică a unor fertilizanti organici, caracterizat prin parcurgerea următoarelor etape: selectarea agenților de control biologic pe criterii biotehnologice, epizootologice și de patogenitate; obținerea culturilor fungice *inocul* în mediu lichid pe baza de glucoză, extract de porumb și săruri, în fază de miceliu vegetativ pre-sporulat; obținerea biomasei fungice inoculante, prin însămânțarea miceliului vegetativ pre-sporulat pe substrat organic nutritiv, până la sporulare completă; sterilizarea mranitei și a compostului în pungi autoclavabile; realizarea amestecurilor dintre biomasa fungică și fertilizantii organici mranita și compost; incubarea amestecurilor în incubator termostatat pentru creșterea și sporularea fungică.
2. Procedeu conform revendicării 1, în care agenții de control biologic sunt tulpini indigene de *Beauveria bassiana* și *B. brongniartii*.
3. Procedeu conform revendicării 1, în care agentul de daunare este filoxera vitei de vie (*Dactylospheera vitifoliae*).
4. Procedeu conform revendicării 1, în care biomasa fungică inoculanta este reprezentată de cultura fungică sporulată pe substrat nutritiv reprezentat de orz (biopreparat fungic granulat).

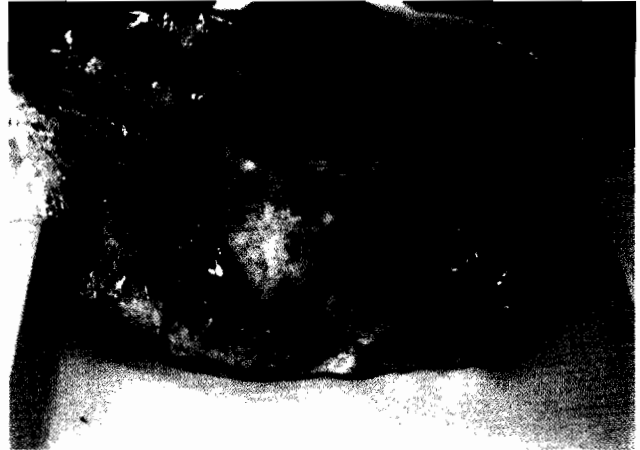
Figura 1

Fertilizanti organici colonizati abundant de fungi entomopatogeni, în procesul de îmbogățire microbiologică

Mranita îmbogățită microbiologic

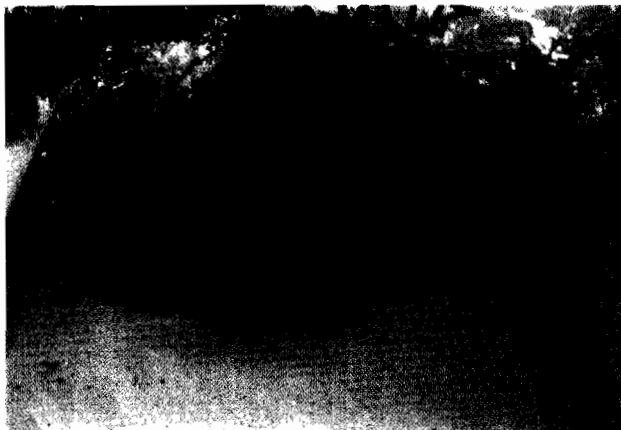


Cultura fungică inoculantă : *Beauveria bassiana*



Cultura fungică inoculantă *Beauveria brongniartii*

Compost îmbogățit microbiologic



Cultura fungică inoculantă : *Beauveria bassiana*



Cultura fungică inoculantă *Beauveria brongniartii*