



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00859**

(22) Data de depozit: **18/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2020** BOPI nr. **10/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **SESAN TATIANA EUGENIA,
BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU NR.
4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **STOICA RUSANDICA,
STR. CPT.GHEORGHE DECUSEARĂ
NR. 10A, BL. E2B, SC. 1, AP. 9, TECUCI,
GL, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA,
STR. PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR. 8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 120944 B1; EP 1990404 A1;
RO 126363 B1**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOSTIMULANT
PENTRU TRATAMENTUL ȘI COLONIZAREA RESTURILOR
VEGETALE ȘI CREȘTEREA TOLERANȚEI LA USCARE
ȘI REACTIVARE PRIN REHIDRATARE A TULPINILOR
BIOSTIMULANTE DE TRICHODERMA**



RO 132517 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui biostimulant pentru
tratamentul și colonizarea resturilor vegetale și de creștere a toleranței la uscare și la reacți-
3 vare prin rehidratare a tulpinilor biostimulante de *Trichoderma*, în special a celor destinate
tratamentului și colonizării resturilor vegetale care acoperă solul în sistemele de agricultură
5 conservativă.

Sunt cunoscute diferite procedee de creștere a toleranței la uscare, destinate tulpini-
7 lor de microorganisme benefice plantelor de cultură care nu prezintă forme de răspândire cu
o (termo)rezistență ridicată, cum sunt de exemplu bacteriile gram-negative sau ciupercile
9 microscopice. Formulările uscate de microorganisme benefice plantelor de cultură (ca de
exemplu pulberile umectabile) sunt cele mai convenabile sub raportul aplicării practice,
11 datorită termenului ridicat de valabilitate, condițiilor normale de păstrare și compatibilității cu
sistemele uzuale de aplicare.

13 O serie de brevete descriu utilizarea unei matrici de polizaharide/hidrocoloizi pentru
traparea microorganismelor și protejarea lor ulterioară față de destructurarea sistemelor
15 celulare, rezultată în timpul procesului de uscare. Celulele vegetative de fixatori de azot
simbiotici din grupul *Rhizobium* (care nu prezintă forme de răspândire cu rezistență ridicată
17 la factorii adverși de mediu) au fost incluse într-un gel polimeric, format din gumă xantan,
făină din fructe de roșcove (carob) și alginat, cărui s-a redus activitatea apei prin uscare
19 la aproape 0,1 (brevet **EP 0083267 B1**). Alginatul, în concentrație de până 10%, a fost folo-
sit, împreună cu ulei (ulei de soia, ulei mineral sau ulei de rapiță) și cu un agent emulsifiant,
21 pentru a menține viabilitatea microorganismelor agro-inoculante/benefice plantelor din
genurile *Pseudomonas*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* (brevet **CA 1300538**
23 **C**). Hidrocoloizi ca alginat, agaroză, pectină slab metilată, alcool polivinilic, carageenan sau
xantan plus făină de carob, împreună cu un crio-protectant care include glicerol în proporție
25 de 10... 50% din masa hidrocoloidului, au fost utilizați pentru condiționarea diferitelor tulpini
de microorganisme benefice plantelor de cultură, inclusiv de *Trichoderma harzianum*,
27 *Trichoderma lignorum* sau *Trichoderma viride*. (document de brevet **US 7422737**). Celulele
vegetative din tulpini antagoniste de *Gliocladium virens*, *Penicillium oxalicum*, *Talaromyces*
29 *flavus* și/sau *Trichoderma viride* au fost formulate prin închidere/încapsulare în granule de
alginat de calciu, urmată de uscarea lentă a acestora (cererea de brevet **US 4818530 A**).
31 Tulpina Td50b de *Trichoderma harzianum* a fost inclusă într-o matrice de făină de rumeguș
parțial hidrolizat și făină de orz și apoi uscată lent (cerere de brevet **EP 2735607 A1**). Uneori
33 hidrocoloizii naturali de tipul polizaharidelor sunt utilizați împreună cu suporturi absorbante
anorganice. Cererea de brevet **FR 2501716 A1** descrie utilizarea silicei precipitate cu: o
35 suprafață specifică sub 150, preferabil 80...120, m²/g; cu o capacitate de absorbție de ulei
de peste 200, preferabil 250...450, ml la 100 g; volumul porilor (prin porozimetrie cu mercur),
37 pentru pori mai mici decât 1000, preferabil 500, angstromi, de cel puțin 70 ml/100 g, ca
suport pentru microorganismele agro-inoculante, în special *Rhizobium*, împreună cu un gel
39 polimeric, pe bază de xantan și făină din fructe de roșcove (carob). Alți hidrocoloizi utilizați
pentru protecția bacteriilor din grupul *Rhizobium* sunt cei sintetici, ca de exemplu polimerul
41 super-adsorbant poliacrilat de sodiu - poliacrilamida, folosit pentru protecția la uscare a
rhizobiilor în combinație cu trehaloza (Brevet **RO 123144 B1**). Cererea de brevet
43 **EP 3082416 A1** revendică utilizarea a diferitelor tipuri de polimeri super-adsorbanti, inclusiv
anorganici de tipul filo-silicaților, împreună cu microorganisme benefice plantelor de cultură.
45 Printre obiectivele urmărite prin realizarea amestecurilor de polimeri super-adsorbanti cu
microorganismele benefice sunt și cele care țin de creșterea ratei de supraviețuire și de
47 eficiență după aplicare. Nu sunt descrise însă obiective ale acestui brevet asociate creșterii
toleranței la uscare sau explicit creșterii ratei de supraviețuire la reactivarea prin rehidratare.

RO 132517 B1

În alte procedee tulpinile de microorganisme benefice plantelor de cultură sunt cultivate în mediu semi-solid, în condiții care să favorizeze acumularea unor forme cu o rezistență mai mare la factorii de mediu adversi, ca de exemplu conidiile aeriene. Mediul semi-solid se usucă împreună cu biomasa de microorganisme, inclusiv formele de răspândire/propagule. La aplicare propagulele se re-hidratează și se reactivează. Cererea de brevet **CN 105586279 A** descrie un procedeu de obținere a biopreparatelor pe bază de *Trichoderma* prin cultivare pe paie de grâu și hidrolizat proteic. Brevetul **US 5422107** 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 **RO 126363 B1** se referă și la un procedeu de conversie a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un biopreparat antifungic pe bază de *Trichoderma viride* Td49) care cuprinde următoarele etape: (i) trecerea 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 pe bază de *Trichoderma viride* Td49, (iv) menținerea timp de 7...8 zile a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră pentru aerarea substratului.

Producerea unor forme mai rezistente la factorii de mediu, de tipul microscleroțiilor, a fost revendicată și pentru medii lichide, cu un conținut ridicat de sursă de carbon, agitate și aerate cu un flux de aer de minimum 0,1 L aer/1 L de mediu/min, care menține nivele de oxigen dizolvat apropiate de zero (Cererea de brevet **US 20160081351 A1**).

Dezavantajul procedeelelor descrise mai sus constau în rata redusă de supraviețuire la uscare și mai ales la reactivare după rehidratare, care limitează capacitatea tulpinilor de *Trichoderma*, inoculate pe diferite substrate prin aplicarea diferitelor biopreparate, de a coloniza respectivele substrate. Formele vegetative încorporate în hidrocolozi se rehidratează cu dificultate, pentru că hidrocoloizii au tendința de a lega moleculele de apă foarte puternic, fapt care împiedică umectarea zonelor interioare. Procesele de rehidratare sunt asociate reluării neorganizate și nestructurate a procesele metabolice oxidative, care determină generarea de specii reactive de oxigen/oxidante cu efect dăunător (**Morgan et al. 2006, Journal of Microbiological Methods, 66, 183-193**). Ca și în cazul uscării, speciile reactive de oxigen/oxidante sunt cele care determină formarea unor leziuni care nu sunt compatibile cu activitatea metabolică coordonată a microorganismelor, analog cu ceea ce se întâmplă în timpul proceselor de ischemie și reperfuzie tisulară (**Cuzzocrea et al. 2001, Pharmacological Reviews, 53, 135-159**).

În cazul particular al tulpinilor de *Trichoderma*, formele mai rezistente la condițiile de mediu adverse, conidii, microscleroți, clamidospori, au o rată relativ redusă de germinare (**Lewis și Papavizas, 1983, Soil Biology and Biochemistry, 15, 351-357**). Acest dezavantaj este foarte relevant pentru tulpinile biostimulante de *Trichoderma* utilizate ca tratament al resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă, pentru că întârzie și limitează colonizarea resturilor vegetale pe care sunt aplicate.

Sistemele de agricultură conservativă (CA) au o serie de avantaje, ca de exemplu reducerea consumurilor de combustibil necesar pentru arătura cu întoarcerea brazdei, limitarea eroziunii și reținerea nutrienților în straturile superioare de sol. Aceste sisteme prezintă însă și o serie de dezavantaje, respectiv întârzierea dezvoltării primelor fenofaze (datorită menținerii solului rece) și favorizarea dezvoltării fitopatogenilor. Aplicarea biopreparatelor cu tulpini biostimulante de *Trichoderma* reprezintă o soluție pentru contracararea acestor

1 dezavantaje specifice sistemelor CA. Colonizarea rapidă a resturilor vegetale de către
2 tulpinile de *Trichoderma* limitează dezvoltarea agenților fitopatogeni (Raut et al. 2015,
3 **Journal of Biotechnology, 208, S62**). Efectul biostimulant compensează întârzierile datorită
4 reducerii temperaturii solului a gradelor de temperatură utile pentru dezvoltarea plantelor de
5 cultură (Oancea et al, 2016. **Studia Universitatis Vasile Goldiș Seria Științele Vieții (Life
6 Sciences Series), 26, 251-260**).

7 Autorii au constatat că sucul de grâu proaspăt protejează în timpul procesului de
8 rehidratare diferitele tipuri de propagule de *Trichoderma* și favorizează reactivarea și coloni-
9 zarea resturilor vegetale. Sucul de grâu proaspăt este însă un produs natural, cu o varia-
10 bilitate ridicată, deci este necesară stabilirea unor valori de prag pentru o serie de caracte-
11 ristici de calitate care asigură reproductibilitatea acțiunii biologice. De asemenea autorii au
12 constatat că sucul de grâu proaspăt are o eficacitate crescută atunci când este aplicat pe
13 microorganisme care au amorsat sistemul de toleranță la factorii de stres, datorită unor
14 factori specifici de cultivare. O astfel de amorsare a toleranței la factorii de stres este indusă
15 de acidul silicic. Acidul silicic, H_4SiO_4 , este cunoscut ca fiind un biostimulant care crește
16 rezistența plantelor la factorii de stres (Savvas și Ntatsi, 2015, **Scientia Horticulturae, 19,
17 66-81**) și ca având un efect de stimulare a creșterii microorganismelor (Wainwright et al.
18 **1997, Mycological Research, 101, 933-938**).

19 Acidul ortosilicic este însă un acid foarte slab, cu patru funcțiuni acide, la care
20 valoarea pKa cea mai mică este de 9,8 (Iler, **The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons,
21 New York, 1979, pg. 207**). Aceasta înseamnă că la pH 9,8 acidul ortosilicic este prezent
22 50% în stare nedisociată și 50% în stare disociată. Între valorile de pH între 2...8, acidul orto-
23 silicic este o moleculă neutră, complet nedisociată. La concentrații mai mari de 2 M începe
24 să polimerizeze, prin reacții de policondensare, cu eliberare de apă (McIntosh, 2012,
25 **Physical Chemistry Chemical Physics, 14: 996-1013**). Datorită acestei tendințe de poli-
26 condensare acidul ortosilicic nu poate fi inclus în mediile de cultură ale microorganismelor
27 în concentrații mari, ci trebuie să fie eliberat constant în concentrații mici, biologic active, din
28 compuși precursori.

29 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă într-un procedeu prin care să se
30 obțină creșterea rezistenței formelor vegetative la uscare, rezistența la factorii de stres,
31 creșterea ratei de activare după rehidratare a formelor vegetative cât și a formelor cu
32 rezistență mai ridicată la factorii de mediu.

33 Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

34 - cultivarea axenică a tulpinilor biostimulante de *Trichoderma*, pe mediu extract de
35 cartof-glucoză, care include 50 mg/l glicin-betaină și 2% dioxid de siliciu coloidal, la pH optim
36 și la aerări care asigură între 1 și 5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, cu
37 varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C, timp
38 de 5 zile;

39 - recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin
40 filtrare sub vacuum de minimum - 0,5 bar;

41 - amestecarea biomasei de microorganisme cu suc proaspăt de grâu, în raport de 1
42 parte biomasă de microorganisme din genul *Trichoderma* la 10 părți suc proaspăt de grâu;

43 - uscarea biomasei de microorganisme, a sucului proaspăt de grâu și a siliciului
44 coloidal, până la maximum 5% umiditate reziduală.

45 Sucul proaspăt de grâu folosit are un conținut total de polifenoli de minimum 2 mg
46 echivalent acid galic per gram și o activitate antioxidantă în testul DPPH, hidrat de 2,2-difenil-
47 1-picril-hidrazil, de min 1,1 mg echivalent trolox per g.

RO 132517 B1

| | |
|---|----|
| Procedeele conform invenției prezintă următoarele avantaje: | 1 |
| - creșterea toleranței la uscarea a formelor vegetative, datorită efectului protector exercitat de glicin-betaină și de polifenolii antioxidanți din suc de grâu, combinat cu amorosarea mecanismelor de rezistență sub efectul fluxului de acid ortosilicic și al șocurilor de temperatură și de aerare; | 3 |
| - creșterea toleranței la reactivare prin rehidratare datorită efectului protector antioxidant complementar exercitat de glicin-betaină și de antioxidanții din suc de grâu; | 5 |
| - adaptarea rapidă a propagulelor tulpinilor reactivate la micro-biotopul specific resturilor vegetale, datorită biodisponibilității crescute a unor compuși specifici materialului vegetal în suc de grâu proaspăt. | 7 |
| În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita. | 9 |
| Exemplul 1 | 11 |
| Într-un bioreactor (Biostat® B, Goettingen, Germania), prevăzut cu senzor de pH și senzor de oxigen dizolvat (DO) (InPro6800; Mettler-Toledo AG, Greifensee, Elveția), prevăzut cu un vas de 5 l, se aduc 2 l mediu (decoct de) cartof-glucoză. Decoctul de cartof se prepară prin fierbere timp de 30 min a 400 g de cartofi, feliați și necurățați de coajă în circa 2 l apă distilată. Se separă prin strecurare prin tifon decoctul, se adaugă în acest decoct 40 g glucoză și se aduce la 2 l. Se suspendă în mediul rezultat 40 g de dioxid de siliciu coloidal, care are o suprafață specifică BET cuprinsă între 270 și 330 m ² /g, un conținut de bioxid de siliciu de minimum 98% și care generează suspensii cu un pH de 5,5. Mediul rezultat se sterilizează prin autoclavare <i>in situ</i> . Se verifică pH-ul și se aduce la pH 5,5 cu HCl 1 M sau NaOH 1 M. Toți reactivii folosiți sunt proveniți de la Merck-Millipore, Darmstadt, Germania, cu excepția dioxidului de siliciu coloidal, care este Aerosil® 300 Pharma (Evonik Resource Efficiency, Hanau-Wolfgang, Germania). Orice alți reactivi care au aceleași caracteristici tehnice pot fi utilizați. | 13 |
| Mediul se inoculează cu 100 ml de suspensie de conidii de <i>Trichoderma asperellum</i> Td36b, NCAIM P(F) 001434, normalizate la 10 ⁸ propagule per ml prin numărare la lamela citometrică. Tulpina <i>T. asperellum</i> Td36b este cunoscută ca având efect de biostimulare a plantelor de cultură (Raut et al. 2015. <i>Journal of Biotechnology</i> , 208, S62). Se cultivă tulpina Td36b timp de 5 zile, la o rată de aerare de 0,1...0,15 L de aer per litru de mediu per min, care asigură între 1 și 5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, cu varierea zilnică a temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C. | 15 |
| Din oră în oră se prelevează aseptice probe de 2...2,4 ml mediu de cultură cu microorganisme, în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Se separă prin centrifugare supernatantul, de sedimentul microbial și de gelul de silice, și se preiau probe de câte 1 ml de supernatant, care este diluat cu 4 ml apă ultrapură, în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber este determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Acest test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația absolută de acid silicic este calculată după construcția unei curbe de calibrare, folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). În mediu de cultură se determină o concentrație de acid ortosilicic care este permanent de sub 1 mM, fiind consecința a două procese concomitente - solubilizarea siliciului sub efectul metabolismului microbial și asimilarea acidului ortosilicic. În sedimentul de microorganisme se determină siliciul total, după mineralizare, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, <i>Geoderma</i> , 209: 251-261). Se constată o continuă creștere a conținutului de siliciu în biomasa de microorganisme, creștere care dovedește asimilarea acidului ortosilicic de către microorganisme. Fluxul de | 17 |
| | 19 |
| | 21 |
| | 23 |
| | 25 |
| | 27 |
| | 29 |
| | 31 |
| | 33 |
| | 35 |
| | 37 |
| | 39 |
| | 41 |
| | 43 |
| | 45 |
| | 47 |

RO 132517 B1

1 acid (orto)silicic prin citoplasmă și depozitarea acestuia în structurile parietale este
2 considerat ca fiind cel care determină amorsarea mecanismelor de toleranță la plante
3 (**Guerriero et al. 2016, *Frontiers in Plant Science*, 7, 463**), iar acest mecanism se pare că
4 este unul comun, care se regăsește și la microorganisme.

5 După terminarea perioadei de cultivare se recoltează biomasa de microorganisme
6 și dioxidul de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de minimum -0,5 bar, folosind
7 o unitate Sartolab® (Sartorius, Goettingen, Germania). Gelul rezultat prin filtrare conține 5 g
8 biomasă *Trichoderma* și este resuspendat cu 50 ml suc de grâu proaspăt. Sucul de grâu este
9 preparat conform metodei recent descrise (**Stoica et al. 2016, *Revista de Chimie*, 67, 1669-
10 1672**). Acest suc proaspăt de grâu are un conținut total de polifenoli de minimum 2 mg
11 echivalent acid galic per gram și o activitate antioxidantă în testul DPPH, hidrat de 2,2-difenil-
12 1-picril-hidrazil, de min 1,1 mg echivalent trolox per g. Determinările acestor caracteristici
13 sunt realizate conform metodelor descrise în lucrarea citată mai sus (**Stoica et al. 2016,
14 *Revista de Chimie*, 67, 1669-1672**). Se completează volumul în care este resuspendat gelul
15 de silice, biomasa de *Trichoderma*, sucul de grâu proaspăt, la 250 ml cu apă pură miliQ
16 (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-Millipore). Suspensia rezultată se usucă până
17 la maximum 5% umiditate reziduală, pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomi-
18 zor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20000 rpm a discului atomi-
19 zor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 130...140°C și la o temperatură de
20 ieșire a agentului de uscare de 75...80°C. O instalație de uscare prin pulverizare care poate
21 fi utilizată în acest scop este de exemplu Niro Production Minor Unit, produsă de Niro Gea
22 (Soeborg, Danemarca) sau Laboratory spray dryer, produsă de ICF Cibec (Maranello, Italia).
23 Orice alt tip de instalație de uscare prin pulverizare, cu caracteristici tehnice similare, poate
24 fi utilizată.

25 **Exemplul 2**

26 Se lucrează la fel ca în exemplul 1, numai că se folosește tulpina *Trichoderma*
27 *harzianum* Td50b, NCAIM (P) F 001412, care are caracteristici de biostimulant pentru plante
28 (**EP 2735607 A1**).

29 **Exemplul 3**

30 Se lucrează la fel ca în exemplul 1, numai că se folosește tulpina *Trichoderma viride*
31 Tv 82, care are caracteristici de biostimulant pentru plante (**Şesan et al. 2015. *Acta Horti
32 Botanici Bucurestiensis*, 42, 63-66**).

33 **Exemplul 4**

34 Pentru evidențierea capacității de colonizare și degradare a materialului vegetal s-a
35 realizat un experiment prin care s-a urmărit consumul de oxigen și eliberarea diferiților
36 compuși din material vegetal tratat cu tulpinile de *Trichoderma* biostimulante utilizate în
37 cadrul exemplelor 1...3 și cu biopreparate obținute prin aplicarea procedurii conform
38 invenției - exemplele 1...3. Materialul vegetal (fân de măzărâche păroasă) a fost măcinat și
39 trecut pe sita de 0,250 mm. S-au ambalat câte 10 g de pulbere care s-au sterilizat prin
40 iradiere gamma (la IRASM, IFIN, București). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte
41 1 g de pulbere de material vegetal, care s-au adus aseptice într-un Erlenmayer de 50 ml,
42 steril. Peste pulberea fin măcinată s-a adăugat 1 ml suspensie microbiană, normalizată la
43 10⁸ propagule per ml, prin numărare citometrică. Suspensia era provenită din liofilizatele ale
44 tulpinilor biostimulante de *Trichoderma* folosite în cadrul exemplelor de mai sus, crescute pe
45 mediu cartof-glucoză sau din biopreparate rezultate prin aplicarea procedurii conform
46 invenției. Probele material vegetal - inocul fungic au fost menținute la termostat timp de
47 120 h, la temperatura de 28°C, după care s-a trecut aseptice într-un vas de respirație Strathox

RO 132517 B1

(Strathkelvin Instruments, Glasgow, Marea Britanie). S-au efectuat determinările de respirație/producere de bioxid de carbon timp de 12 h. După efectuarea determinărilor de respirație s-au separat prin centrifugare supernatantele, în care s-a determinat Carbonul Organic Total (TOC) cu un aparat Formacs HT (Skalar Analytical B.V., Breda Olanda), glucidele reducătoare (cu reactiv DNS) și fosforul solubil total (cu molidat de amoniu și reactiv clorostanic). Probele au fost analizate comparativ cu un martor neinoculat - martor negativ. Acest martor conferă informații referitoare la comportamentul unor probe ideale, fără activitate biologică de degradare a substratului vegetal. În această variantă, substratul vegetal nu a fost inoculat cu microorganisme și a fost menținut în condiții identice de incubare cu cele ale probelor test. Acesta oferă informații referitoare la cantitatea maximă de oxigen care ar putea fi consumată în probe fără activitate de biodegradare externă, datorită proceselor reziduale enzimatiche interne.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. Aceste rezultate demonstrează că, procedeul conform invenției crește semnificativ toleranța la uscare și la reactivare prin rehidratare, cu efecte evidente în ceea ce privește rata de colonizare și degradare a materialului vegetal.

*Activitatea de degradare a materialului vegetal de către tulpinile biostimulante de Trichoderma, rehidratate după diferite procedee de uscare, respectiv liofilizare sau procedeul realizat conform invenției**

Tabelul 1

| Tulpina, proces de uscare | Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară) | Conținut de carbon organic total în supernatant (mcg/l) | Glucide solubile (mcg/l) | Fosfor solubil (mcg/l) |
|---------------------------|---|---|--------------------------|------------------------|
| Td36b, liofilizare | 1,42 ± 0,22b | 4,23 ± 1,21b | 11,82 ± 0,47b | 18,27 ± 1,52b |
| Td36 b, conf. Ex. 1 | 2,28 ± 0,16a | 7,62 ± 1,27a | 28,42 ± 0,84a | 37,73 ± 4,12a |
| Td50b, liofilizare | 1,52 ± 0,09b | 4,42 ± 1,03b | 12,41 ± 0,61 b | 16,82 ± 1,32b |
| Td50b, conf. Ex. 2 | 2,17 ± 0,07a | 7,54 ± 2,02a | 28,77 ± 0,63a | 35,41 ± 3,24a |
| Tv82, liofilizare | 0,81 ± 0,12c | 3,43 ± 0,27c | 5,67 ± 0,68c | 7,24 ± 0,94c |
| Tv 82, conf. Ex. 3 | 1,87 ± 0,21ab | 5,89 ± 3,16ab | 22,24 ± 0,82ab | 18,87 ± 2,17b |

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P > 0,05.

RO 132517 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a unui biostimulant pentru tratamentul și colonizarea resturilor vegetale și de creștere a toleranței la uscare și la reactivare prin rehidratare a tulpinilor biostimulante de *Trichoderma*, **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit din următoarele etape:

7

- cultivarea axenică a tulpinilor biostimulante de *Trichoderma*, pe mediu extract de cartof-glucoză, care include 50 mg/l glicin-betaină și 2% dioxid de siliciu coloidal, la pH optim și la aerări care asigură între 1 și 5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C, timp de 5 zile;

11

- recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de minimum - 0,5 bar;

13

- amestecarea biomasei de microorganisme cu suc proaspăt de grâu, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme din genul *Trichoderma* la 10 părți suc proaspăt de grâu;

15

- uscarea biomasei de microorganisme, a sucului proaspăt de grâu și a siliciului coloidal, până la maximum 5% umiditate reziduală.

17

19

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, suc proaspăt de grâu folosit are un conținut total de polifenoli de minimum 2 mg echivalent acid galic per gram și o activitate antioxidantă în testul DPPH, hidrat de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, de minimum 1,1 mg echivalent trolox per g.

21



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 434/2020