



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00839

(22) Data de depozit: 29/12/2022

(41) Data publicării cererii:
28/04/2023 BOPI nr. 4/2023

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

(72) Inventatori:
• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS. MIHAI BRAVU NR.297, BL. 15A, SC.A,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BALA IOANA, STR.POIANA CU ALUNI,
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TRITEAN NAOMI, STR.
PERFEȚIONĂRII, NR.11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• POPA DARIA GABRIELA, STR.BISTRIȚEI,
NR.2, PLOIEȘTI, PH, RO

(54) BIOSTIMULANT FOLIAR PE BAZĂ DE SPORI
ȘI METABOLIȚI DE *TRICHODERMA* ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de biostimulant cu aplicare foliară pentru tratamentul plantelor horticole, care include spori ai tulpinilor biostimulante de *Trichoderma* și metaboliți ai acestora, și la un procedeu de obținere a compoziției. Compoziția conform invenției este constituită din următoarele componente exprimate în procente în greutate: 89,23...89,28% esteri ai acizilor grași din rapiță sau floarea - soarelui, 9,68...9,73% n - hexadecan, 0,22...0,32 hidrofobine, 0,22...0,25% 6 - pentil - pironă și $4,2...4,5 \times 10^9$ spori hidrofobi din tulpini de *Trichoderma*. Procedeu de obținere conform invenției constă în sterilizarea prin autoclavare a unor biofilme de *Trichoderma*, preluarea aseptică a suporturilor artificiale mobile cu biofilme fungale și introducerea lor aseptică în bioreactoare cu mediu de 4% zer și 1% extract de drojdie și n - hexadecan, incubarea timp de 3 zile a suporturilor artificiale mobile cu biofilme

fungale în mediu de cultură, iradierea cu laser albastru și continuarea incubării încă 4 zile, oprirea fermentației și recuperarea prin decantare a suporturilor artificiale mobile și prin centrifugare la 5000 x g a fracției n - hexadecanice, extracția repetată de 3 ori cu esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță sau floarea - soarelui a biofilmelor de pe suporturile artificiale mobile pentru recuperarea sporilor hidrofobi și a hidrofobinelor din biofilme, urmată de reunirea fracțiilor n - hexadecanice, care conțin 6 - pentil - pironă, și de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță sau floarea - soarelui, care conține spori hidrofobi și hidrofobine, și diluarea cu esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță sau de floarea - soarelui.

Revendicări: 3



BIOSTIMULANT FOLIAR PE BAZĂ DE SPORI ȘI METABOLIȚI DE *TRICHODERMA* ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la o compoziție de biostimulant pentru plante cu aplicare foliară, care include spori ai tulpinilor biostimulante de *Trichoderma* și metaboliți ai acestora, și la un procedeu de obținere a acestei compoziții destinate tratamentului plantelor horticole.

Sunt cunoscute diferite compoziții pe bază de tulpini de *Trichoderma* destinate aplicării foliare. *Trichoderma / Hypocrea* este un gen de microorganisme benefic plantelor de cultură, care își are originea în sol / rizosfera plantelor (Alfiky & Weisskopf, 2021, *Journal of Fungi*, 7, 61). Rizosfera este o nișă ecologică care oferă condiții mult mai favorabile comparativ cu filosfera – umiditate, pH și temperaturi (relativ) constante, o varietate de substrate care pot fi utilizate ca surse de carbon și energie, o paletă completă (în cele mai multe cazuri) de oligo- și micro-elemente (Philippot et al. 2013, *Nature Reviews Microbiology*, 11, 789-799). Filosfera este o nișă ecologică caracterizată de factori cu variabilitate mult mai ridicată – temperatură care se modifică în cursul zilei și în funcție de expunerea la soare, umiditate extrem de variabilă, pH care este influențat mult mai semnificativ de factorii de mediu externi, surse de carbon și energie limitate, oligo- și microelemente care provin doar din depunerile de praf (Vorholt, 2012, *Nature Reviews Microbiology*, 10, 828-840). Rolul microorganismelor din rizosferă este însă foarte important pentru creșterea toleranței plantelor la stresurile biotice și abiotice amplificate de schimbările climatice (Bashir et al. 2022, *Microbiological Research*, 254, 126888; Gong & Xin, 2021, *Journal of Integrative Plant Biology*, 63, 297-304). Aplicarea foliară a diferitelor tulpini de *Trichoderma* s-a dovedit a fi benefică pentru combaterea factorilor de stres biotic și abiotic și pentru creșterea calității recoltei (Sesan et al. 2020, *Microorganisms*, 8, 123; Saxena et al. 2016, *Journal of Plant Growth Regulation*, 35, 377-389; Galletti et al. 2008, *BioControl*, 53, 917-930).

Cererea de brevet WO2020089933 A1 se referă la o formulare de bioprodus pe bază de *Trichoderma*, utilă împotriva bolilor foliare, alcătuită din trei sau patru componente. Prima componentă omogenă I cuprinde 10-30% frunze de eucalipt, uscate și măcinate, 50-85% pulbere de biomasă de *Trichoderma harzianum*, 5-20% pulbere din șrot de jir de fag indian (karanj, *Millettia pinnata*). Componenta a II-a este alcătuită din 50-80% ulei agricol, 20-30% apă și 2-30% unul sau mai mulți agenți emulsifianți selectați din grupul constând din glicerină, Tween 20 și propilenglicol. Cea de-a III-a componentă

include o sursă de carbon, ca de ex. glucoză, într-un procent de 2 până la 10 %. Cea de-a patra componentă, opțională, este un agent structural aplicată într-un procent de 2 până la 10 %. Componenta omogenă I este 2 - 25% din biopreparat, iar componenta II este 65-90% din greutate din biopreparat. Pentru a proteja propagulele de *Trichoderma* față de condițiile dificile din filosferă compoziția include frunze de eucalipt, care au un conținut ridicat de polifenoli anti-oxidanți.

Brevetul RO132517 B1 se referă la un procedeu de obținere a unui biostimulant pe bază de *Trichoderma* cu toleranță crescută la uscare și reactivare prin rehidratare. Procedeu conform invenției constă în cultivarea axenică a tulpinilor pe un mediu care conține glicin-betaină și dioxid de siliciu coloidal, la pH de 5,5, și la aerări care asigură 1...5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, la o temperatură de incubare ce variază cu un interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C, timp de 5 zile, recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vid, amestecarea biomasei cu suc proaspăt de grâu, având un conținut total de polifenoli de minimum 2 mg, echivalent acid galic per gram, și uscarea amestecului până la maximum 5% umiditate reziduală. Protecția propagulelor de *Trichoderma* față de condițiile adverse de mediu este asigurată de acumularea osmoprotectanților din mediul de cultură (glicin-betaină), și de polifenolii antioxidanți din sucul de grâu, combinat cu amorsarea mecanismelor de rezistență sub efectul fluxului de acid ortosilicic și al șocurilor de temperatură și de aerare.

Dezavantajul procedeelelor descrise mai sus este că nu prevăd condiții care să favorizeze acumularea unor forme cu o rezistență mai mare la factorii de mediu adverși, ca de exemplu conidiile aeriene. Un exemplu este cel al cultivării pe medii semisolide, care favorizează formarea de spori aeriene cu rezistență mare la factorii de mediu adverși (Munoz et al. 1995, *FEMS Microbiology Letters*, 125, 63-69). De obicei mediul 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.

Producerea unor forme mai rezistente la factorii de mediu, de tipul microscleroților, 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 cât mai reduse (brevet US 9642372 B2).



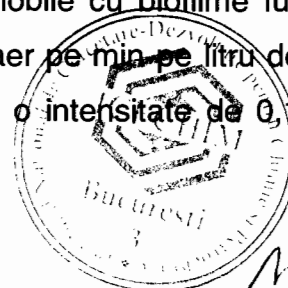
Dezavantajul acestor tipuri de procedee, de cultivare pe medii semisolide sau în care se menține un nivel de oxigen dizolvat apropiat de zero este perioada lungă de cultivare. De asemenea, procedeele și/sau compozițiile descrise până în prezent nu prezintă soluții pentru recuperarea / utilizarea în compoziții a metaboliților semi-volatili, cum este de exemplu 6-pentil-pirona, care are un rol important în obținerea unor rezultate benefice după aplicarea foliară (Pascale et al. 2017, *Crop Protection*, 92, 176-181; Dini et al. 2020, *Antioxidants*, 9, 284; Carillo, et al. 2020, *Plants*, 9, 771). O problemă tehnică suplimentară este dată de toxicitatea 6-pentil-pironei pentru tulpinile de *Trichoderma*, la o concentrație mai mare de 100 ppm în mediul de cultură (Serrano-Carreón et al. 2002, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 170-174).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție care să includă forme de spori cu rezistență ridicată la condițiile adverse de mediu, și metaboliți semivolatili.

Compoziția, conform invenției, este alcătuită din 89,23-89,28% esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui, 9,68-9,73% n-hexadecan, 0,22-0,32% hidrofovine și 0,22-0,25% 6-pentil-pironă și $4,2-4,5 \times 10^9$ spori hidrofobi din tulpini de *Trichoderma*.

Procedeeul, conform invenției, este alcătuit din următoarele etape:

- Sterilizarea prin autoclavare a unor suporturi artificiale mobile (SAM) realizate din polipropilenă izotactică, cu masa moleculară de cca 250 kDa, cu temperatura de topire de peste 200°C, densitatea de 970-980 kg.m⁻³ și suprafață specifică de fixare a biofilmului de cel puțin 700 m².m⁻³;
- Formarea pe suprafața SAM a unor biofilme de *Trichoderma* prin incubarea a 50 grame de SAM timp de 120 ore la 25°C, în culturi de *Trichoderma*, dezvoltate anterior timp de 5 zile la 25°C, în 300 ml mediu lichid extract de cartof - glucoză, agitat și aerat la 100 rpm, în erlenmeyere de 1000 ml;
- Preluarea aseptică prin decantare din culturile de *Trichoderma* a suporturilor artificiale mobile cu biofilme fungale și introducerea lor aseptică în bioreactoare de 10 litri, care conțin 5,4 litri de mediu cu 4% zer și 1% extract de drojdie și 0,6 litri de n-hexadecan, în raport de 100 grame suporturi artificiale mobile la 1 litru de mediu;
- Incubarea timp de 3 zile a suporturilor artificiale mobile cu biofilme fungale în mediul de cultură, la 25°C, cu o rată de aerare de 1 litru aer pe minut pe litru de mediu, agitare 60 rpm, iradierea cu laser albastru de 440 nm la o intensitate de 0,15 μmoli



fotoni.m⁻².s⁻¹ timp de 300 secunde după 3 zile și continuarea incubării încă 4 zile, în aceleași condiții;

- Oprirea fermentației și recuperarea prin decantare a suporturilor artificiale mobile și prin centrifugare la 5000xg a fracției n-hexadecanice;
- Extracția repetată de trei ori cu esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui a biofilmelor de pe suporturile artificiale mobile, pentru recuperarea sporilor hidrofobi și a hidrofobinelor din biofilme;
- Reunirea fracțiilor n-hexadecanică, care conține 6-pentil-pironă, și de esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui, care conține spori hidrofobi și hidrofobine, în raport de 1 parte la respectiv 3 părți, și diluarea cu alte 6 părți de esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui.

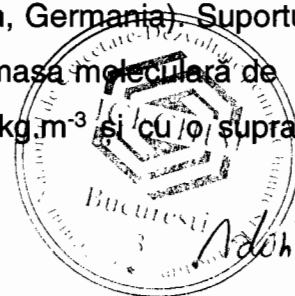
Extracția sporilor hidrofobi din biofilmele de pe suporturile artificiale mobile în esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui se realizează în raport de 1 parte suporturi artificiale mobile la 1 parte esteri etilici și este asistată de ultrasunete, aplicate la o putere de 400 W timp de 30 secunde.

Invenția prezintă următoarele avantaje.

- ✓ Stimulează formarea clamidosporilor hidrofobi rezistenți la factori adversi de mediu și a hidrofobinelor datorită cultivării în biofilme fungale pe suporturi de polipropilenă și a aplicării laserului albastru, care activează genele responsabile pentru formarea unor astfel de formațiuni sporale.
- ✓ Favorizează acumularea 6-pentil-pironei hidrofobe în fracția n-hexadecanică, la nivele ridicate, care nu sunt toxice pentru fungii care se dezvoltă în mediu apos
- ✓ Recoltează din biofilmele fungale și concentrează sporii hidrofobi rezistenți la factori adversi de mediu și hidrofobinele.
- ✓ Formează o compoziție care este ușor emulsionabilă și cu bune caracteristici de stropire și de etalare pe frunze datorită efectului emulsifiant combinat al esterilor etilici și al hidrofobinelor.

În cele ce urmează se prezintă exemple de realizarea a invenției, care o ilustrează fără a-i limita domeniul de aplicare.

Exemplu 1. Se introduc în erlenmeyere de 500 ml câte 50 grame de suporturi artificiale mobile, se etanșează cu dop de vată și se autoclavează la 121°C timp de 20 min (utilizând de ex. o autoclavă Systec VE-55, Systec, Linden, Germania). Suporturile artificiale mobile sunt realizate din polipropilenă izotactică, cu masa moleculară de 250 kDa și cu densitatea apropiată de cea a apei de 970 - 980 kg.m⁻³ și cu o suprafață



5

specifică de $700 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$. Forma de suporturi artificiale mobile este cea cunoscută, de roțiță cu spițe în interior și striții pe exterior (MBBR, *moving bed biofilm reactors* - Jiang et al. 2016, *Bioresource Technology*, 218, 360-366). Câte 50 grame de suporturi artificiale mobile sterilizate, respectiv cele dintr-un erlenmeyer, se trec aseptice într-o cultură a unei tulpini de *Trichoderma* producătoare de 6-pentil-pironă, *T. harzianum* Td50b NCAIM(P) F 001412. Cultura a fost dezvoltată anterior timp de 5 zile la 25°C , în erlenmeyere de 1000 ml, care conțineau 300 ml mediu lichid extract de cartof - glucoză, agitat și aerat la 100 rpm, pe agitator orbital cu incubator (de ex. Unimax 2010, Schwabach, Germania). Se incubă cele 50 grame de suporturi artificiale mobile timp de 5 zile la 25°C . După trecerea celor 5 zile, se decantează suporturile artificiale mobile pe care s-au dezvoltat biofilme fungale. Suporturile artificiale din 12 erlenmeyere, respectiv 600 grame, se introduc aseptice într-un bioreactor de 10 litri (de ex. BioFlo 320, Eppendorf, Hamburg, Germania). În prealabil în bioreactor s-au preparat 5,4 litri de mediu cu 4% zer și 1% extract de drojdie și 0,6 litri de n-hexadecan, care s-au sterilizat *in-situ* timp de 20 min la 121°C . Se incubă timp de 3 zile suporturile artificiale mobile cu biofilme fungale în mediul de cultură. Incubarea se realizează la 25°C , cu o rată de aerare de 1 litru aer pe min. pe litru de mediu și agitare 60 rpm. După 3 zile se procedează la iradierea suspensiei de SAM – biofilme fungale – mediu de cultură cu un laser albastru de 440 nm (de ex. B440, Apel Laser, Mogoșoaia, România). Iradierea se realizează la o intensitate de $0,15 \text{ } \mu\text{moli fotoni} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, timp de 300 secunde. După iradiere se continuă incubarea încă 4 zile, în aceleași condiții - la 25°C , cu o rată de aerare de 1 litru aer pe min pe litru de mediu, agitare 60 rpm. După trecerea celor 4 zile se oprește fermentația și se recuperează prin decantare suporturile artificiale mobile. și prin centrifugare la 5000xg fracția n-hexadecanică (de ex. pe un separator centrifugal continuu Laboratory Separator SA 1-02-175, GEA Westfalia Separator Group, Oelde, Germania, operat la o viteză a discurilor de centrifugare de 6.200 rpm, echivalent la o forță centrifugală relativă de 5000 x g și la o rată de alimentare de 0,5 litri/min).

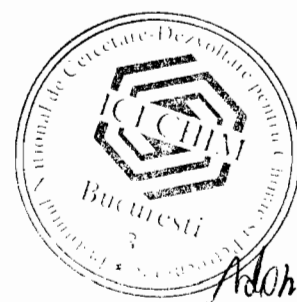
Suporturile artificiale mobile cu biofilme se trec într-un berzelius de 2 litri și se extrag cu 600 grame esteri etilici ai acizilor grași din rapiță, pentru recuperarea sporilor hidrofobi și a hidrofobinelor din biofilme. Extracția este asistată de ultrasunete, care se aplică la o putere de 400 W timp de 30 secunde (printr-o sonotrodă, de ex. cu un echipament VC 505, Sonics, Newtown, CT, USA). Se repetă extracția de 3 ori cu câte 600 grame esteri etilici ai acizilor grași din rapiță.



Se reunește fracția n-hexadecanică, separată prin centrifugare, și care conține 6-pentil-pironă cu fracția de esteri etilici ai acizilor grași din rapiță, care conține spori hidrofobi și hidrofobine. Se amestecă 100 grame fracție n-hexadecanică cu 300 grame soluție de esteri etilici ai acizilor grași din rapiță. Cele 400 grame de amestec se diluează suplimentar cu 600 grame de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță.

În compoziția rezultată se determină principalele fracții hidrofobe prin analiză termogravimetrică, pentru că au fiecare puncte de fierbere diferite – 286,9°C fracția n-hexanică, 340°C – fracția de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță. Conținutul de hidrofobine se determină cu reactiv Coomassie brilliant blue G-250 (Georgiou et al., 2008, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 391-403), iar conținutul de 6-pentil-pironă se determină gaz-cromatografic (Keszler et al., 2000, *Journal of Chromatographic Science*, 38, 421-424). Numărul de spori de *Trichoderma* a fost determinat nefelometric (Schütz et al. 2020, *BioTechniques*, 68, 279-282). Compoziția rezultată este alcătuită din 89,28% esteri etilici ai acizilor grași din rapiță, 9,68% n-hexadecan, 0,22% hidrofobine, 0,25% 6-pentil-pironă și $4,5 \times 10^9$ spori hidrofobi din tulpina Td50b de *Trichoderma*, diferența până la 100% fiind apă reziduală.

Exemplu 2. Se lucrează ca în Exemplu 1, cu următoarele diferențe. Tulpina de *Trichoderma* folosită este *T. asperelum* Td36b, depozitată sub numărul NCAIM(P)F001434. Se folosesc esteri etilici ai acizilor grași din ulei de floarea-soarelui. Compoziția rezultată este alcătuită din 89,23% esteri etilici ai acizilor grași din ulei de floarea-soarelui, 9,73% n-hexadecan, 0,32% hidrofobine, 0,22% 6-pentil-pironă și $4,2-4,5 \times 10^9$ spori hidrofobi din tulpina Td36b de *Trichoderma*.



Revendicări

1. Compoziție de biostimulant foliar conform invenției, **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 89,23-89,28% esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui, 9,68-9,73% n-hexadecan, 0,22-0,32 hidrofobine, 0,22-0,25% 6-pentil-pironă și $4,2-4,5 \times 10^9$ spori hidrofobi din tulpini de *Trichoderma*.

2. Procedeu de obținere a compoziției de biostimulant foliar conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: sterilizarea prin autoclavare a unor suporturi artificiale mobile realizate din polipropilenă izotactică, cu masa moleculară de cca 250 kDa, cu temperatura de topire de peste 200°C, densitatea de 970-980 kg.m⁻³ și suprafață specifică de fixare a biofilmului de cel puțin 700 m².m⁻³; formarea pe suprafața suporturilor artificiale mobile a unor biofilme de *Trichoderma* prin incubarea a 50 grame dintre acestea timp de 48 ore la 25°C, în culturi de *Trichoderma*, dezvoltate anterior timp de 5 zile la 25°C, în 300 ml mediu lichid extract de cartof - glucoză, agitat și aerat la 100 rpm, în erlenmeyere de 1000 ml; preluarea aseptică prin decantare din culturile de *Trichoderma* a suporturilor artificiale mobile cu biofilme fungale și introducerea lor aseptică în bioreactoare de 10 litri, care conțin 5,4 litri de mediu cu 4% zer și 1% extract de drojdie și 0,6 litri de n-hexadecan, în raport de 100 grame suporturi artificiale mobile la 1 litru de mediu; incubarea timp de 3 zile a suporturilor artificiale mobile cu biofilme fungale în mediul de cultură, la 25°C, cu o rată de aerare de 1 litru aer pe min pe litru de mediu, agitare 60 rpm, iradierea cu laser albastru de 440 nm la o intensitate de 0,15 μmoli fotoni.m⁻².s⁻¹ timp de 300 secunde după 3 zile și continuarea incubării încă 4 zile, în aceleași condiții; oprirea fermentației și recuperarea prin decantare a suporturilor artificiale mobile și prin centrifugare la 5000xg a fracției n-hexadecanice; extracția repetată de trei ori cu esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui a biofilmelor de pe suporturile artificiale mobile, pentru recuperarea sporilor hidrofobi și a hidrofobinelor din biofilme; reunirea fracțiilor n-hexadecanică, care conține 6-pentil-pironă, și de esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui, care conține spori hidrofobi, în raport de 1 parte la 3 părți, și diluarea cu alte 6 părți de esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui.

3. Procedeu de obținere a compoziției de biostimulant foliar conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** extracția sporilor hidrofobi din biofilmele de pe suporturile artificiale mobile în esteri etilici ai acizilor grași din rapiță sau floarea-soarelui se realizează în raport de 1 parte suporturi artificiale mobile la 1 parte esteri etilici și este asistată de ultrasunete, aplicate la o putere de 400 W timp de 30 secunde.

