



MD 4196 C1 2013.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4196** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A01N 63/00* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0040 (22) Data depozit: 2012.04.27</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.02.28, BOPI nr. 2/2013</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: MUNTEANU Natalia, MD; TODERAȘ Ion, MD; MOLDOVAN Anna, MD; MALEVANCIUC Nadejda, MD; TODERAȘ Lidia, MD; RAILEAN Nadejda, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) **Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* -bioinsecticid
pentru combaterea coleopterelor curculionoide**

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea coleopterelor curculionoide.

Tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, izolată din mediu natural, este depozitată în Colecția Națională de Micro-organisme Nematogene cu numărul CNMN-

2

BB-03 și poate fi utilizată pentru producerea bioinsecticidelor.

Tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-03 manifestă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelor curculionoide.

Revendicări: 1

5

10

MD 4196 C1 2013.09.30

(54) Strain of bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* - bioinsecticide for Curculionidae control

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology and can be used in agriculture for Curculionidae control.

The strain of bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, isolated from natural environment, is deposited in the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms

2
5 under the number CNMN-BB-03 and can be used for the production of bioinsecticides.

10 The strain of bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-03 exhibits pronounced insecticidal activity against Curculionidae.

15 Claims: 1

(54) Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, - биоинсектицид для борьбы с жуками-долгоносиками

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в сельском хозяйстве для борьбы с жуками-долгоносиками.

Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, изолированный из природной среды, депонирован в Национальной Коллекции Непатогенных Микро-

2
5 организмов под номером CNMN-BB-03 и может быть использован для производства биоинсектицидов.

10 Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-03 проявляет выраженную инсектицидную активность против жуков-долгоносиков.

15 П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* care poate fi utilizată pentru combaterea coleopterelor curculionoide – dăunători ai pomilor fructiferi și culturilor agricole.

5 Mai multe soiuri de fructe semincere, inclusiv de mere, pere și gutui, sunt cultivate în zonele cu climă temperată. Numeroase specii de coleoptere curculionoide pot provoca daune pomilor fructiferi și culturilor agricole, cele mai susceptibile specii depind atât de tipul de pomi fructiferi și culturi agricole, cât și de zona geografică.

10 Împotriva coleopterelor curculionoide se utilizează diferite insecticide și alți patogeni biologici, însă aplicarea largă a acestor preparate este limitată, deoarece ele manifestă acțiuni negative asupra altor insecte benefice și provoacă poluarea mediului ambiant.

Elaborarea metodelor inofensive și totodată efective de combatere a coleopterelor curculionoide este una dintre problemele stringente și actuale.

15 Controlul microbiologic al insectelor dăunătoare a fost adesea considerat ca o alternativă favorabilă folosirii insecticidelor chimice, care posedă acțiune nespecifică, poluează mediul ambiant și se acumulează în aer, apă și sol.

Bacillus thuringiensis (Bt) este o bacterie cunoscută ca un agent important în controlul biologic. Aceasta este utilizată pe scară largă ca bioinsecticid pentru controlul multor insecte dăunătoare și constituie baza a peste 90% din biopesticidele disponibile în comerț datorită absenței efectelor toxice asupra omului și altor organisme homeoterme, precum și asupra mediului ambiant.

20 Este cunoscută tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* H3a3b cu proprietăți insecticide asupra lepidopterelor dăunătoare [1].

25 Dezavantajul tulpinii constă în aceea că se utilizează numai pentru lepidopterele dăunătoare.

Este cunoscută tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* IPM-46 care este activă împotriva dăunătorilor din ordinul lepidopterelor și coleopterelor [2].

30 Dezavantajul tulpinii este dificultatea obținerii și utilizarea preparatelor costisitoare pentru modificarea genetică a tulpinii parentale *Bacillus thuringiensis* subsp. HD-73, activă contra lepidopterelor. De asemenea există riscul scăderii activității insecticide a tulpinii de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* IPM-46 modificate genetic.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în izolarea din mediul natural a unei tulpini de bacterii *Bacillus thuringiensis* – producătoare de proteine cu efecte insecticide, cu o activitate înaltă și specifică contra coleopterelor curculionoide.

35 Problema a fost soluționată prin identificarea tulpinii de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, izolată din corpul insectei *Neocoenorhinidius pauxillus* Germ. (Thiery I., Frachon E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, pp. 55-73. In: Lacey A.L. (eds) Manual of techniques in Insect Pathology, Academic Press, London), colectată pe teritoriul Republicii Moldova.

40 Tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, izolată din mediu natural, este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene cu numărul CNMN-BB-03 și poate fi utilizată pentru producerea bioinsecticidelor.

Tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-03 manifestă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelor curculionoide.

45 Tulpina de bacterii sintetizează proteine cu efecte insecticide și poate fi utilizată în calitate de insecticid biologic pentru combaterea coleopterelor curculionoide.

Rezultatul obținut este determinat de particularitățile biochimice ale tulpinii propuse.

50 Tulpina propusă nu este patogenă pentru organismele homeoterme și se păstrează în tuburi pe medii agarizate T3 (Travers R., Martin P., Reichelderfer C. Selective process for efficient isolation of soils Bacillus spp. Appl. Environ. Microbiol. 1987, 53 (6): 1263-1266), la temperatura de 4°C în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

55 Pentru cultivarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv cu următoarea componență (g/L): Tripton (sau Casein Trypsic Peptone) – 3, triptoză – 2; extract de drojzii – 1,5; NaH₂PO₄xH₂O – 6,9; MnCl₂x4H₂O – 0,008; agar – 15; pH – 6,8.

Caracteristicile morfologice: bacterii gram-pozitive cu spori. Celulele vegetative sunt mari și mobile, dispuse câte una, în perechi sau în lanțuri. Mărimea celulelor variază de la

1,5...1,7 până la 3,6...6,2 μm . Formează și produc incluziuni proteice cristaline de formă bipiramidală. Pe mediul nutritiv agarizat peste 24 ore tulpina formează colonii de culoare albă-gri cu marginea filiformă și suprafața mată.

5 Caracteristicile taxonomice și biochimice ale tulpinii: microorganism aerob facultativ anaerob. Tulpina crește în limitele de temperatură 5...40°C. Temperatura optimă de creștere 28...32°C. Valoarea optimă a pH-ului pentru dezvoltarea tulpinii este 5,2. Tulpina produce catalază, hidrolizează amidonul și cazeina, lichiefiază gelatina. Formează acetilmetil-carbinol, lecitinază și urează. Nu descompune esculina și salicina. Nu formează acizi și gaze din maltoză, lactoză și zaharoză. Asimilează glucoza, manoză cu formarea de acid. Nu
10 formează sulfat de hidrogen și indol. Tulpina sintetizează δ -endotoxine cu proprietăți insecticide.

Invenția poate fi ilustrată prin următoarele exemple de utilizare a tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

15 Tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* este cultivată timp de o zi pe agitator la temperatura de 30°C pe un mediu nutritiv agarizat T3 cu următoarea componență (g/L): Tripton (sau Casein Trypsic Peptone) – 3, triptoză – 2; extract de drojzii – 1,5; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ – 6,9; $\text{MnCl}_2 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ – 0,008; agar – 15; pH – 6,8. Celulele sunt precipitate, resuspendate în apă distilată și incubate într-un agitator rotativ pentru o noapte la 30°C. In
20 acest timp celulele lizează eliberând spori și cristale. Ulterior este determinată concentrația de spori, de cristale și de δ -endotoxină din lichidul cultural rezultat. Concentrația de spori este determinată după numărul de colonii în creștere pe mediu agarizat T3 după însămânțarea diluției. Prezența cristalelor este monitorizată prin microscopie cu contrast de fază. Prezența δ -endotoxinei este determinată prin reacția de precipitare, iar conținutul lor cantitativ – folosind ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

25 Se pregătește suspensia de contaminare în apă distilată cu diferită concentrație: $1,3 \times 10^9$ spori/mL, $1,3 \times 10^8$ spori/mL, $1,3 \times 10^7$ spori/mL, $1,3 \times 10^6$ spori/mL, $1,3 \times 10^5$ spori/mL. Cele mai efective dintre concentrațiile testate s-au dovedit a fi $1,3 \times 10^9$ spori/mL pentru *Neocoenorhinius pauxillus* Germ., *Sitona lineatus* L. și $1,3 \times 10^8$ spori/mL pentru *Phyllobius oblongus* L.

30 În experiență se utilizează insecte din familia *Curculionidae* (Coleoptera), în special cei mai periculoși dăunători ai pomilor fructiferi *Neocoenorhinius pauxillus* Germ., *Phyllobius oblongus* L. și *Sitona lineatus* L. – dăunător al culturilor agricole.

Efectul insecticid al tulpinii este evaluat prin monitorizarea efectivului numeric al dăunătorilor colectați după prelucrare și cantitatea exemplarelor de gândaci pieriți după
35 infectare.

Exemplul 1

Estimarea eficacității tulpinii propuse pentru combaterea dăunătorului pomilor fructiferi *Neocoenorhinius pauxillus* Germ. (Coleoptera, *Rhynchitidae*).

40 Activitatea insecticidă a tulpinii de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* a fost testată pe coleopterele adulte provenite din aceeași populație a speciei *Neocoenorhinius pauxillus* Germ. Se prepară o serie din cinci diluții ale culturii tulpinii de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* în soluție de 0,9% NaCl cu pasul 10 (concentrațiile indicate mai sus). În calitate de martor a fost utilizată soluția de 0,9% NaCl. În suspensiile pregătite
45 au fost introduse frunze de măr de aproximativ aceeași mărime. Frunzele au fost uscate la temperatura de 20°C și plasate în vase Petri. Pentru fiecare diluție au fost utilizate câte 10 insecte și 2...5 frunze de măr tratate. Mortalitatea insectelor a fost cuantificată după 3 zile de incubație în incubator la 21°C și fotoperioada de 18 ore.

Activitatea biologică a tulpinii exprimată în LC_{50} a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentrației de spori în diluțiile culturii bacteriene: $\lg \text{LC}_{50} = \lg C_M - \sigma$ (50 $\Sigma L - 0,5$), unde C_M – concentrația maximă testată; σ – logaritmul multiplicării diluției; ΣL – suma valorilor L pentru toate concentrațiile. Rezultatele sunt prezentate în tabel.

Cultura bacteriană *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* în soluție de 0,9% NaCl, în concentrație de $1,3 \times 10^9$ spori/mL, provoacă o reducere cu 80% a efectivului dăunătorului *Neocoenorhinius pauxillus* Germ. pe măr (vezi tabelul).

55 Exemplul 2

Estimarea eficacității tulpinii propuse pentru combaterea dăunătorului pomilor fructiferi *Phyllobius oblongus* L. (Coleoptera, *Curculionidae*).

Activitatea insecticidă a tulpinii de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* a fost testată pe coleopterele adulte provenite din aceeași populație a speciei *Phyllobius oblongus* L. Se prepară o serie din cinci diluții ale culturii bacteriene în soluție de 0,9% NaCl cu pasul 10 (concentrațiile indicate mai sus).

5 În calitate de martor a fost utilizată soluție de 0,9% NaCl. În suspensiile pregătite au fost introduse frunze de măr de aproximativ aceeași mărime. Frunzele au fost uscate la temperatura de 20°C și plasate în vase Petri. Pentru fiecare diluție au fost utilizate câte 10 insecte și 2...5 frunze de măr tratate.

10 Mortalitatea insectelor a fost cuantificată după 3 zile de incubație în incubator la 21°C și fotoperioada de 18 ore.

Activitatea biologică a tulpinii exprimată în LC_{50} a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentrației de spori în diluțiile culturii bacteriene: $\lg LC_{50} = \lg C_M - \sigma (\Sigma L - 0,5)$, unde C_M – concentrația maximă testată; σ – logaritmul multiplicării diluției; ΣL – suma valorilor L pentru toate concentrațiile. Rezultatele sunt prezentate în tabel.

15 Cultura bacteriană *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* în soluție de 0,9% NaCl, în concentrație de $1,3 \times 10^8$ spori/mL, provoacă o reducere cu 73,3% a efectivului dăunătorului *Phyllobius oblongus* L. pe măr (vezi tabelul).

Exemplul 3

20 Estimarea eficacității tulpinii propuse pentru combaterea dăunătorului lucernei *Sitona lineatus* L. (Coleoptera, *Curculionidae*).

Activitatea insecticidă a tulpinii de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* a fost testată pe coleopterele adulte provenite din aceeași populație a speciei *Sitona lineatus* L. Se prepară o serie din cinci diluții ale culturii bacteriene în soluție de 0,9% NaCl cu pasul 10 (concentrațiile indicate mai sus). În calitate de martor a fost utilizată soluția de 0,9% NaCl. 25 În suspensiile pregătite au fost introduse frunze de lucernă de aproximativ aceeași mărime. Frunzele au fost uscate la temperatura de 20°C și plasate în vase Petri. Pentru fiecare diluție au fost utilizate câte 10 insecte și 2...5 frunze de lucernă tratate. Mortalitatea insectelor a fost cuantificată după 3 zile de incubație în incubator la 21°C și fotoperioada de 18 ore.

30 Activitatea biologică a tulpinii exprimată în LC_{50} a fost calculată după formula lui Kerber în valorile concentrației de spori în diluții ale culturii bacteriene: $\lg LC_{50} = \lg C_M - \sigma (\Sigma L - 0,5)$, unde C_M – concentrația maximă testată; σ – logaritmul multiplicării diluției; ΣL – suma valorilor L pentru toate concentrațiile. Rezultatele sunt prezentate în tabel.

35 Cultura bacteriană *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* în soluție de 0,9% NaCl, în concentrație de $1,3 \times 10^9$ spori/mL, provoacă o reducere cu 66,6% a efectivului dăunătorului *Sitona lineatus* L. pe lucernă (vezi tabelul).

Tabel

Nivelul pieirii dăunătorilor pomilor fructiferi după prelucrarea cu suspensie de tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Nr.	Specia dăunătorului	Nivelul pieirii insectelor după prelucrare cu diverse concentrații de suspensie bacteriană (%)					Martor NaCl (0,9%)	Activitatea insecticidă LC_{50} spori/mL
		$1,3 \times 10^9$ spori/mL	$1,3 \times 10^8$ spori/mL	$1,3 \times 10^7$ spori/mL	$1,3 \times 10^6$ spori/mL	$1,3 \times 10^5$ spori/mL		
1.	<i>Neocoenorhinidius pauxillus</i> Germ.	80,0	76,6	76,6	66,6	53,3	3,3	$1,229 \times 10^6$
2.	<i>Phyllobius oblongus</i> L.	73,3	73,3	70,0	56,6	50,0	3,3	$2,467 \times 10^6$
3.	<i>Sitona lineatus</i> L.	66,6	63,3	60,0	43,3	33,3	3,3	$9,152 \times 10^6$

40

Așadar, tulpina bacteriană propusă *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra coleopterelelor curculionoidae și poate fi utilizată ca agent biologic în controlul efectivului lor numeric. Tulpina este ecologic inofensivă, deoarece este extrasă dintr-un mediu natural, nu este patogenă pentru plante și organisme 45 homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme noi, ceea ce exclude deteriorarea ecosistemului cum se observă în cazul utilizării altor patogeni și preparate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2080065 C1 1997.05.27
2. RU 2167528 C1 2001.05.27

(57) Revendicări:

Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-03 in calitate de bioinsecticid pentru combaterea coleopterelor curculionoide.

Șef Secție:	COLESNIC Inesa
Examinator:	DUBĂSARU Nina
Redactor:	LOZOVANU Maria