



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00973**

(22) Data de depozit: **07/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/09/2017** BOPI nr. **9/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2014** BOPI nr. **6/2014**

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

(72) Inventatori:  
• **DINU MIHAELA MONICA,  
STR. ZECE MESE NR. 21, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **FĂTU ANA CRISTINA, STR. HĂȚIȘULUI  
NR. 5, BL. H12, SC. 1, ET. 1, AP. 5,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ANDREI ANA-MARIA, STR. PORUMBACU  
NR. 9, BL. 31, SC. 1, ET. 4, AP. 29, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**SANTA, HERTA STUTZ DALIA ET AL.,  
"SPORE PRODUCTION OF BEAUVERIA  
BASSIANA FROM AGROINDUSTRIAL  
RESIDUES", BRAZ. ARCH. BIOL.  
TECHNOL. [ONLINE], VOL. 48, PP. 51-60,  
2005; JENKINS N. E. ET AL.,  
"DEVELOPMENT OF MASS PRODUCTION  
TECHNOLOGY FOR AERIAL CONIDIA  
FOR USE AS MYCOPESTICIDES",  
BIOCONTROL NEWS INF. 19,  
PP. 21-31, 1998**

(54) **SUBSTRAT NUTRITIV ȘI DE FORMULARE  
PENTRU *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL**



# RO 129513 B1

1           Invenția se referă la un substrat nutritiv și de formulare pentru *Beauveria bassiana*  
(Balsamo) Vuillemin.

3           Insectele de depozit se hrănesc cu conținutul boabelor de fasole, distrugând în între-  
gime cotiledoanele și embrionul, afectând astfel valoarea biologică a acestora (germinație,  
5 dezvoltare, creșterea viitoarelor plântuțe). Daunele provocate sunt calitative și cantitative,  
în depozite atacul ducând la pierderi de 100% dacă nu se intervine cu măsuri de combatere.

7           Semințe de fasole depreciate rezultă și din activitatea de creștere în condiții contro-  
late (crescătorii de insecte) a gărgărițelor (*Acanthoscelides obtectus* Say), în laboratoare de  
9 entomologie, în care se fac studii de bioecologie, în vederea elaborării metodelor de comba-  
tere a dăunătorilor de depozit.

11           *Beaveria bassiana* este un microorganism entomopatogen ale cărui însușiri biologice  
(patogenitate/virulență, stabilitate genetică), biotehnologice (productivitate, stabilitate în  
13 formulări) și ecologice (caracter epizootic, persistența în mediu, toleranța față de factori  
adverși) îi conferă calitatea de agent de combatere biologică a insectelor dăunătoare. Avan-  
15 tajele utilizării entomopatogenilor fungici, legate în principal de protecția mediului și siguranța  
alimentară, au condus la dezvoltarea unor tehnologii de obținere la scară comercială și de  
17 aplicare a acestora ca insecticide biologice.

Dezvoltarea micopesticidelor confruntă cercetarea cu diferite probleme tehnice. În  
19 comparație cu producerea agenților chimici, obținerea micoinsecticidelor este asociată, din  
punct de vedere tehnologic, cu condiții speciale (**Andersh, W. 1992 "Produktion von Pilzen  
21 als Pflanzenschutzmittel", Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 45, 129-142**). Cultivarea  
microorganismelor la scară industrială și menținerea viabilității celulelor cu activitate insec-  
23 tucidă sunt condiții esențiale, a căror realizare influențează decisiv acceptarea agenților  
microbieni de protecție a plantelor. Numai formulări bine definite, stabile și standardizate eco-  
25 nomic, biologic active, pot deveni produse microbiologice comerciale. Răspândirea (accep-  
tarea) produselor microbiologice depinde de măsura în care sunt satisfăcute aceste condiții  
27 (**Soper, R. S., Ward, M. G. 1981 "Produktion, Formulation and Application pf Fungi for  
insect Control"**). În acest sens, utilizarea cu succes a bioinsecticidelor fungice este condițio-  
29 nată de calitatea "substanței active" (spori de *B. bassiana*), care, pentru a asigura eficacitate  
biologică, trebuie să fie virulentă și să aibă competențe ecologice, și de funcționarea unor  
31 tehnologii de cultivare, care să asigure producții mari de spori, în condiții de eficiență  
economică.

33           În literatura de specialitate sunt prezentate rezultate privind cultivarea ciupercii *B.*  
*bassiana* pe următoarele substraturi nutritive: pastă de cartofi (**Kral, J., S. Neubauer 1953  
35 Pouziti entomofytnica hubrodu beauveria proti mandelince bramorove. Zool. A  
Ent.Listy2, 241-250**); deșeuri de grâu amestecate cu pleavă de orez (**Gouli S. et al. 1997  
37 Isolation of fungi associated with hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae).  
Journal of Invertebrate Pathology. 1997;70:76-77**); amestec de malț, agar și pudră din  
39 larve de *Galleria mellonella* (**El-Sufty R. et al. Mansour 1993 "Microbial control of the  
greater wax moth, *Galleria mellonella* by the entomopathogenic fungus, *Beauveria  
41 bassiana* (Bals.) Vuill". Egyptian Journal of Biological Pest Control, Vol.3, Issue2 ,  
pp.163-167**); orez umectat cu apă de nucă de cocos (**Ibrahim, Y.B., 1993**); extract de porumb  
43 și zaharoză/tarâțe grâu (**Blachere, H. et al. 1973 "Etude de la formulation et de la  
conservation d'une preparation entomopathogime a base de blastospores de  
45 *Beuveha tenella* (Delacr. Siemaszko)", Annales de Zoologie Ecologie Animale 5, (I),  
69-79**); amestec de sorg, făină de mei și porumb zdrobit (**Karanja LW et. al "Effect of  
47 different solid substrates on mass production of entomopathogens, *Beauveria***

*bassiana* and *Metarhizium anisopliae*", 12 th KARI Biennial Scientific Conference, 8-12 November 2010, Nairobi, Kenya); reziduuri industriale de cartofi, borhot de trestie de zahăr, coji de cafea (Santa, Herta Stutz Dalia et al. "Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues", Braz. arch. biol. technol.[online]. 2005, vol. 48, n.spe, pp. 51-60. ISSN 1516-8913); făină de orz (Jenkins N. E. et al. 1998 "Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides". Biocontrol News Inf. 19, 21-31N).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în selectarea unui substrat de creștere (mediu de cultivare) ieftin, accesibil și nutritiv, care asigură obținerea "substanței active" a biopreparatelor fungice entomopatogene pe bază de *B. bassiana*, în condiții de eficiență economică. Utilizarea acestui nou mediu de cultivare, provenit din valorificarea unor deșeuri de produse alimentare (boabe de fasole depreciate calitativ), identificat drept substrat nutritiv și de formulare pentru entomopatogenul *B. bassiana*, în vederea obținerii de bioinsecticide, asigură dezvoltarea unei cantități mari de biomasă fungică, cu proprietăți care îi asigură calitatea de agent de combatere biologică a insectelor dăunătoare.

Substratul nutritiv și de formulare pentru *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, conform invenției, este constituit din: 50 de părți apă și 50 de părți deșeu de boabe de fasole, rezultate ca subprodus din creșterea în masă a insectelor, sau provenite din depozite infestate cu insecte dăunătoare, părțile fiind exprimate în greutate.

Cultivarea speciei *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin pe un astfel de substrat nutritiv și de formulare se face prin: introducerea unui amestec de 200 părți deșeuri de boabe de fasole și 200 părți apă de robinet, în pungi de polipropilenă de 50 μm grosime și dimensiunea de 300/600 mm, prevăzute cu câte un tub de pexal acoperit cu dop de vată, autoclavarea la o temperatură de 121°C, timp de 60 min, răcirea până la o temperatură de 20...30°C, inocularea cu 10 părți suspensie de spori, conținând 10<sup>7</sup> spori de *Beauveria bassiana*, agitarea manuală pentru răspândirea cât mai uniformă a biomasei fungice inoculate, așezarea în poziție orizontală, și presarea ușoară a boabelor, pentru formarea unui singur strat de boabe și incubarea pungilor inoculate, timp de 14...21 zile, la 24...26°C, în condiții staționare.

Având în vedere faptul că microorganismele entomopatogene fungice au un ciclu biologic bifazic, respectiv, faza de miceliu vegetativ și faza reproductivă, în mod curent, obținerea biomasei fungice se face printr-un procedeu difazic, care cuprinde obținerea miceliului vegetativ în mediu de cultură lichid și obținerea sporilor fungici (conidii) pe mediu de cultură solid. Obținerea culturii fungice lichide reprezintă o fază foarte costisitoare a procesului tehnologic, consumatoare de energie, necesitând forță de muncă calificată, aparatură specială de laborator, substanțe și reactivi costisitori.

Avantajele invenției sunt în legătură cu:

- calitatea "substanței active": procedeul de colonizare microbiană a substratului organic care face obiectul prezentei invenției asigură obținerea unei biomase fungice robuste, cu capacitate crescută de supraviețuire și răspândire; introdusă în sol, în ciuda rezistenței naturale a habitatului, aceasta își păstrează viabilitatea și caracterul de patogenitate. Biomasa fungică rezultată prin acest procedeu conține o cantitate mare de "substanță" biologic activă, cu efect insecticid și de ameliorare a calității solului;

- eficiența economică a procedurii de cultivare, ce rezultă din valorificarea superioară a unor deșeuri din categoria produselor agroalimentare depozitate, pentru multiplicarea unor microorganismele entomopatogene cu rol de agenți de control biologic al insectelor dăunătoare;

# RO 129513 B1

1 - scăderea prețului de cost al procedurii de fermentație microbiană, implicit al bio-  
preparatului fungic, prin scurtarea perioadei de colonizare a substratului organic de creștere:  
3 conform invenției, pentru cultivarea tulpinilor fungice pe boabe de fasole, nu mai este necesară  
5 parcurgerea fazei de multiplicare în mediu lichid pentru colonizarea substratului nutritiv  
(boabe de fasole), inocularea acestuia fiind făcută direct cu conidii obținute pe mediu solid.

În continuare, se prezintă exemple de realizare a invenției:

7 **Exemplul 1. Izolarea/caracterizarea tulpinii de *B. bassiana* utilizate pentru testarea  
substratului nutritiv (boabe de fasole infestate cu gărgărițe)**

9 Materialul biologic folosit pentru izolarea unei tulpini de *B. bassiana* a fost reprezentat  
de dipterul *Sciara sp.* (musculița neagră), în stadiul de adult, colectat din focar epizootic  
11 natural. După izolare prin metoda izolării directe, tulpina fungică (BbSc) a fost purificată și  
conservată în eprubete, pe mediu înclinat peptona-dextroza-agar (PDA), la 4°C. Coloniile  
13 fungice monosporale au fost analizate morfocultural și patologic.

S-au obținut următoarele rezultate, privind dinamica creșterii vegetative a tulpinii  
15 BbSc pe diferite medii de cultură:

| Mediul de cultură | Diametrul coloniilor (mm) după ... zile: |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                   | 3  | 4     | 5     | 6     | 7     | 10    | 11    | 12    | 13    |
| Czapek            | 3,59                                     | 5,17  | 8,22  | 10,86 | 16,33 | 26,22 | 28,00 | 28,61 | 32,39 |
| Sabouraud         | 3,76                                     | 5,72  | 7,67  | 9,00  | 11,39 | 16,78 | 17,56 | 18,06 | 18,89 |
| PDA               | 6,83                                     | 10,17 | 13,78 | 19,44 | 26,22 | 35,78 | 37,67 | 39,87 | 41,36 |

23 Caracteristicile morfologice ale tulpinii BbSc sunt prezentate în tabelul următor:

| Aspecte morfologice la 10 zile | Mediul de cultură sintetic |                          |                        |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|
|                                | Czapek                     | Sabouraud                | PDA                    |
| Forma                          | rotundă                    | rotundă, bombată         | rotundă, puțin bombată |
| Profil secțiune                | plat                       | semisferic, aspect vătos | plat                   |
| Conturul coloniei              | filamentos                 | întreg                   | regulat                |
| Transparență                   | translucidă                | opac                     | opac                   |
| Sporulare                      | prezentă                   | prezentă                 | prezentă               |

33 Evaluarea gradului de patogenitate al tulpinii BbSc s-a făcut pe următoarele insecte  
35 de depozit, prin contaminarea substratului de creștere cu biomasa fungică (BbSc) sporulată:  
gărgărița grâului (*Sitophilus granarius L.*), gândacul din Surinam (*Oryzaephilus surinamensis L.*),  
37 gândacul roșcat al făinii (*Tribolium castaneum* Herbst.), gândacul de făină (*Tenebrio molitor L.*),  
molia fructelor uscate (*Plodia interpunctella Hubner*), molia stupilor (*Galleria mellonella L.*),  
39 gărgărița fasolei (*Acanthoscelides obtectus Say*). Insectele au fost crescute în condiții controlate,  
în crescătoria de insecte a Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor,  
41 București (ICDPP), pe medii naturale nutritive specifice. Evidențierea mortalității induse de tulpina  
fungică BbSc s-a făcut prin metoda "camerei umede". Pentru stabilirea procentului de mortalitate  
43 s-au luat în calcul indivizii care au evidențiat, în decurs de 48...72 h, simptomele infecției micotice.  
Rezultatele obținute (procente de mortalitate cuprinse între 25...80%) au demonstrat faptul că entomopatogenul  
45 *B. bassiana*, tulpina BbSc, este patogenă față de insectele de depozit, manifestând, față de acestea, grade  
diferite de virulență.  
47

## Exemplul 2. Cultivarea tulpinii fungice BbSc pe boabe de fasole autoclavate

S-a verificat posibilitatea cultivării ciupercii *B. bassiana* pe mediu solid, reprezentat de boabe de fasole provenite din crescătoria de insecte a ICDPP și rezultând ca subprodus din creșterea în masă a gărgăriței fasolei (*A. obtectus*) ca insecta test pentru analize de laborator. Cultivarea s-a făcut în pungi de plastic autoclavabile (tip DELTALAB), cu dimensiunea de 300/600 mm, prevăzute, pentru aerisire și inoculare, cu câte un tub de pexal acoperit cu dop de vată. Pentru fiecare pungă, s-au cântărit câte 200 g boabe fasole și s-au adăugat 200 ml apă de robinet. După autoclavare (1,0 atm) la temperatura de 121°C, timp de 60 min, apoi răcire până la temperatura de 20...30°C, pungile au fost inoculate, în condiții aseptice, cu conidii provenite din culturi pe mediu agarizat. După inoculare, pungile au fost agitate manual, pentru răspândirea cât mai uniformă a biomasei fungice inoculante, apoi așezate în poziție orizontală și presate ușor, până la dispunerea boabelor de fasole într-un singur strat. După 15 zile de incubare la 24...26°C, în condiții staționare, fiecare bob de fasole s-a acoperit complet cu miceliu fungic sporulat, de culoare albă, cu aspect prăfos. S-a obținut o producție medie de biomasă fungică de  $1,1 \times 10^9$  conidii/g substrat nutritiv (boabe de fasole), rezultat care demonstrează faptul că boabele de fasole reprezintă un substrat nutritiv valorificat eficient de *B. bassiana* pentru sporularea fungică.

## Exemplul 3. Testarea competențelor bioecologice ale biomasei fungice

Având în vedere faptul că *B. bassiana* crescută pe boabe de fasole va fi utilizată ca agent de combatere a dăunătorilor care au stadii de dezvoltare în sol, substratul organic micozat (exemplul 1) a fost evaluat din punct de vedere al măsurii în care durata de incubare în sol influențează parametrii biologici ai biomasei fungice. Testul s-a desfășurat în condiții de câmp experimental și a constatat în analiza microbiologică a tulpinii fungice introduse în sol pe substrat organic (adâncimea de 10 cm), din punct de vedere al capacității de germinare, de multiplicare și de răspândire în mediu. După 15, 30, respectiv, 60 zile de la inocularea solului, s-au prelevat probe de sol; analiza microbiologică a probelor de sol s-a făcut după 24 h de la prelevare, perioadă în care acestea au fost păstrate în pungi de plastic, la 4°C. Adâncimea de prelevare a probelor a fost de 0...5 cm, respectiv, 5...10 cm, fiecare probă analizată (S1, S2, S3) fiind rezultată din amestecarea a câte 15 subprobe; din amestecul obținut s-au luat probe medii de 10 g pentru examenul microbiologic de laborator. Proba finală a fost uscată în aer liber, pentru stoparea activității microbiologice înainte de analiza de laborator; pentru aceasta, solul a fost presărat în strat de 1 cm pe o folie de aluminiu. Pentru examinarea și analiza microbiologică a probelor de sol s-a folosit metoda examinării directe prin microscopie optică și metoda spălării solului. Pentru evaluarea cantitativă a conidiilor de *B. bassiana* reizolate din sol, s-a aplicat tehnica suspensiilor diluate: s-au făcut diluții succesive din suspensii apoase de sol (2 g sol/100 ml apă sterilizată). Câte 1 ml din fiecare diluție s-a însămânțat pe câte o cutie Petri cu diametrul de 10 cm. Numărarea coloniilor s-a făcut după 72 h de incubare la 23°C. Pentru fiecare diluție s-au utilizat câte 3 cutii Petri. Metoda hematocitometrică s-a folosit pentru determinarea numărului de conidii la unitatea de volum de apă.

Pentru evaluarea puterii de germinare a conidiilor, suspensiile conidiene (10 μl/placă) au fost însămânțate pe mediu agarizat, incubat la 28°C. Testul de germinare a fost făcut la 24, 48 și 72 h. Caracterizarea patologică a tulpinii fungice reizolate din sol s-a făcut, în condiții de laborator, prin metoda biotestării pe insecta test *Plodia interpunctella*. Rezultatele au fost interpretate static (ANOVA, Program Biostat 2008) și prin metoda probitului.

Examinarea directă a terenurilor din câmpurile experimentale, înainte de prelevarea probelor, a evidențiat faptul că patogenul a colonizat solul în grade diferite, în zonele tratate fiind identificat miceliul alb al ciupercii. După 15 zile de la aplicarea substratului organic micozat, procentul de regăsire a conidiilor la adâncimea de 5 cm, a avut valori > 85%; la adâncimea de 10 cm, valoarea procentului a scăzut cu aproximativ 40%; după 30 de zile de

# RO 129513 B1

la aplicarea tratamentului, procentul de regăsire a conidiilor s-a menținut la valori foarte ridicate: 73...81%. Observațiile efectuate la 60 zile după aplicarea produsului biologic au evidențiat scăderea de 1,9 x a cantității de patogen din sol. Prelucrarea statistică a datelor a evidențiat faptul că durata perioadei de incubare în sol a indus modificări semnificative ( $p < 0,05$ ) în procentul de regăsire a entomopatogenului inoculat în sol. Rezultatele privind evaluarea capacității de colonizare a solului de către biomasa fungică dezvoltată pe boabe de fasole sunt prezentate în tabelul de mai jos:

| Intervalul de observație<br>(nr. zile după aplicarea biomasei<br>fungice) | Proba de sol                                     |      |      |      |       |       |
|---|--|------|------|------|-------|-------|
|   | S1   |      | S2   |      | S3    |       |
|   | Adâncimea probei de sol (cm)                     |      |      |      |       |       |
|   | 0-5  | 5-10 | 0-5  | 5-10 | 0-5   | 5-10  |
|   | Număr conidii x 10 <sup>10</sup> /m <sup>2</sup> |      |      |      |       |       |
| T0 (martor)   | 9,23   |      | 7,94 |      | 11,03 |       |
| 15  | 7,85   | 3,69 | 6,75 | 3,18 | 9,37  | 4,141 |
| 30  | 7,38   | 6,92 | 6,35 | 5,95 | 8,93  | 8,27  |
| 60  | 4,86   | 4,85 | 4,18 | 4,19 | 5,80  | 5,81  |

Rezultatele privind evaluarea puterii germinative a sporilor de *B. bassiana* reisolați din sol, la diferite intervale de timp după aplicarea tratamentelor biologice, sunt prezentate în tabelul următor:

| Intervalul de observație<br>(nr. zile după aplicarea biomasei<br>fungice) | Perioada de incubare a<br>culturilor<br>fungice | Proba de sol                 |      |      |      |      |      |
|---|---|------------------------------|------|------|------|------|------|
|   |   | I                            |      | II   |      | III  |      |
|   |   | Adâncimea probei de sol (cm) |      |      |      |      |      |
|   |   | 0-5                          | 5-10 | 0-5  | 5-10 | 0-5  | 5-10 |
|   |   | Germinare conidii (%)        |      |      |      |      |      |
| 15  | 24  | 54,5                         | 56,3 | 53,6 | 52,7 | 55,4 | 55,4 |
|   | 48  | 80                           | 52,7 | 64,5 | 60   | 68,1 | 63,6 |
|   | 72  | 84,5                         | 77,2 | 75,4 | 69,0 | 78,1 | 76,9 |
| 30  | 24  | 53,6                         | 52,7 | 45,4 | 45,4 | 45,4 | 44,5 |
|   | 48  | 72,7                         | 67,2 | 57,2 | 53,6 | 63,6 | 59,0 |
|   | 72  | 80,9                         | 70   | 71,8 | 65,4 | 74,5 | 68,1 |
| 60  | 24  | 38,1                         | 37   | 37,7 | 31,8 | 39   | 37,2 |
|   | 48  | 55,4                         | 51,8 | 50   | 46,3 | 53,6 | 50   |
|   | 72  | 63,6                         | 60   | 60,9 | 57,2 | 66,3 | 60,9 |

# RO 129513 B1

Procentul de germinare a conidiilor a înregistrat valori maxime (71...93%) după 60 h, indiferent de adâncimea de la care au fost prelevate probele. Comparativ cu varianta martor (incubare în condiții controlate), cea mai mare scădere a capacității de germinație a conidiilor s-a înregistrat după 60 de zile de incubare în sol. Prelucrarea statistică a datelor demonstrează faptul că durata perioadei de incubare în sol a indus modificări foarte înalt semnificative ( $p < 0,001$ ) în capacitatea de germinație a conidiilor. 1  
3  
5

Pentru decelarea modificării unor însușiri morfoculturale, conidiile reizolate din terenul experimental au fost însămânțate pe mediu agarizat (PDA), parametrul biologic selectat pentru această evaluare fiind capacitatea de multiplicare vegetativă a entomopatogenului. În proba S1, rata medie zilnică de creștere a avut valori cuprinse între 0,51...0,67 cm în stratul superficial al solului (0...5 cm), respectiv, între 0,39...0,43 cm, la adâncimea de 10 cm. În proba S2, rata medie zilnică de creștere a conidiilor izolate din profilele de sol analizate (5 și 10 cm) a înregistrat valori medii de 0,28 cm/24 h. În proba S3, s-au înregistrat rate de creștere asemănătoare, cu maxime de 0,31 cm/24 h și minime de 0,21 cm/24 h. Prelucrarea statistică a datelor evidențiază faptul că durata perioadei de incubare în sol nu a indus modificări semnificative ( $p > 0,05$ ) în capacitatea de multiplicare vegetativă a entomopatogenului *B. bassiana*. 7  
9  
11  
13  
15  
17

S-a testat virulența biomasei fungice după reizolare din sol, de la adâncimea de 5 cm (insecta test *A. obtectus*). Pe baza procentelor de mortalitate înregistrate, s-au obținut valorile dozelor letale (50%) exprimate în număr conidii/g mediu de creștere ( $\times 10^5$ ): S1: 1,03 > 1,01 > 0,50; S2: 2,12 > 2,07 > 1,03; S3: 1,89 > 1,84 > 0,93. 19  
21

Rezultatele obținute demonstrează faptul că boabele de fasole depreciate calitativ, urmare a infestării cu insecte de depozit, reprezintă un mediu pe care entomopatogenul *B. bassiana* îl poate exploata ca substratul nutritiv, în condiții de stabilitate a parametrilor ecobiologici responsabili de eficacitatea tratamentelor cu biopreparate entomopatogene. 23  
25

## Revendicări

1

3

1. Substrat nutritiv și de formulare pentru *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, **caracterizat prin aceea că** este constituit din 50 de părți apă și 50 de părți deșeu de boabe de fasole, rezultate ca subprodus din creșterea în masă a insectelor, sau provenite din depozite infestate cu insecte dăunătoare, părțile fiind exprimate în greutate.

5

7

2. Procedeu de cultivare a speciei *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin pe un substrat nutritiv și de formulare, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este constituit din: introducerea unui amestec de 200 părți deșeuri de boabe de fasole și 200 părți apă de robinet, în pungi de polipropilenă de 50 μm grosime și dimensiunea de 300/600 mm, prevăzute cu câte un tub de pexal acoperit cu dop de vată, autoclavarea la o temperatură de 121°C, timp de 60 min, răcirea până la o temperatură de 20...30°C, inocularea cu 10 părți suspensie de spori conținând  $10^7$  spori de *Beauveria bassiana*, agitarea manuală, pentru răspândirea cât mai uniformă a biomasei fungice inoculate, așezarea în poziție orizontală și presarea ușoară a boabelor pentru formarea unui singur strat de boabe, și incubarea pungilor inoculate, timp de 14...21 zile, la 24...26°C, în condiții staționare.

9

11

13

15



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 442/2017