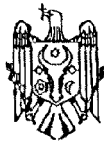




MD 4304 B1 2014.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4304** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2013 0057 (22) Data depozit: 2013.08.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.09.30, BOPI nr. 9/2014
(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; BACAL Svetlana, MD; RAILEAN Nadejda, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* - bioinsecticid
pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la microbiologie și biotehnologie, și poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*.

Tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, izolată din mediul natural, este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene cu numărul

2
CNMN-BB-04 și poate fi utilizată pentru producerea bioinsecticidelor.

Tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-04 manifestă o activitate insecticidă pronunțată asupra lepidopterelor din genul *Lymantria*.

Revendicări: 1

MD 4304 B1 2014.09.30

(54) Strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bacteria - bioinsecticide for the control of *Lymantria* genus lepidopterans

(57) Abstract:

1

The invention relates to microbiology and biotechnology, and can be used in agriculture for the control of *Lymantria* genus lepidopterans.

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

2

with the number CNMN-BB-04 and can be used for the production of bioinsecticides.

The strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-04 bacteria exhibits pronounced insecticidal activity against *Lymantria* genus lepidopterans.

Claims: 1

(54) Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* - биоинсектицид для борьбы с чешуекрылыми рода *Lymantria*

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии, и может быть использовано в сельском хозяйстве для борьбы с чешуекрылыми из рода *Lymantria*.

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

2

Микроорганизмов под номером CNMN-BB-04 и может быть использован для производства биоинсектицидов.

Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-04 проявляет выраженную инсектицидную активность против чешуекрылых рода *Lymantria*.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și biotehnologie și poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*.

- 5 Mai multe soiuri de fructe semănțoase, inclusiv de mere, pere și gutui, sunt cultivate în zonele cu climă temperată. O diversitate bogată de insecte atacă aceste tipuri de fructe în toată lumea. Lepidopterele sunt considerate dăunători des întâlniți în multe state din Europa și inclusiv în Republica Moldova (Жигальцева М.И. Комплекс листовёрток вредителей плодового сада в Молдавии с обоснованием методов борьбы//М.И. Жигальцева: Автореф. дис. канд. с.-х. наук. Ленинград, 1959, 20 p).

- 10 Numeroase specii de lepidoptere pot provoca daune pomilor fructiferi, cele mai susceptibile specii depind atât de tipul de pomi fructiferi, cât și de zona geografică (David J. Carter Pest Lepidoptera of Europe: with special reference to the British Isles. Springer Science&Business media, 1984, 431 p.).

- 15 Împotriva lepidopterelor se utilizează un spectru larg de insecticide, însă aplicarea acestor preparate manifestă acțiuni negative asupra organismelor nevizate (Гулий В.В., Памужак Н.Г. Справочник по защите растений для фермеров. Кишинев, Universitas, М.: Росагросервис, 1992, 464 p)

- 20 Elaborarea metodelor inofensive și totodată efective de combatere a lepidopterelor este una dintre problemele stringente și actuale.

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.

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

- 30 Este cunoscută tulpina *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Z-52, utilizată pentru obținerea preparatului "Lepidocid" – insecticid biologic pentru combaterea lepidopterelor [1].

Cea mai apropiată după esență și rezultatul tehnic este tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* B-159/252Bt, activă împotriva dăunătorilor din ordinul Lepidoptera [2].

- 35 Dezavantajul acestei tulpini constă în faptul că activitatea ei insecticidă este mai puțin eficientă. Respectiv, pentru obținerea tulpinii în cantități industriale se vor consuma mai mulți reactivi pentru mediul de cultivare, implicând cheltuieli suplimentare, ca urmare sporind costul produsului. Un alt dezavantaj este cantitatea mare de spori per mililitru introdusă în mediul ambiant, pentru asigurarea efectului insecticid.

- 40 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea din mediul natural a unei tulpini autohtone noi de bacterii *Bacillus thuringiensis*, care ar asigura producerea de proteine cu efecte insecticide și cu o activitate mai înaltă contra lepidopterelor.

- 45 Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM sub nr. CNMN BB-04 în calitate de bioinsecticid pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*.

Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că tulpina propusă:

- posedă o activitate insecticidă mai înaltă asupra lepidopterelor față de cea mai apropiată soluție;
- este o tulpină autohtonă, ceea ce reduce semnificativ costurile pentru obținerea bioinsecticidelor și asigură micșorarea gradului de poluare a mediului ambiant.

Rezultatul tehnic, în special efectul insecticid obținut, este determinat de particularitățile biochimice ale tulpinii, și anume de capacitatea de a sintetiza δ -endotoxine.

- 55 Cultura 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), p. 1263-1266), la

temperatura de 4°C în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

- 5 Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Phyllobius oblongus* L. (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), colectate pe teritoriul Republicii Moldova.

Pentru cultivarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv cu următoarea componență (g/l): tripton (sau Casein Trypsic Peptone) – 3; triptoză – 2; extract de drojdii – 1,5; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 6,9; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; agar – 15; pH – 6,8.

- 10 Caracterele morfo-culturale ale tulpinii: 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 cristalice de formă bipiramidală. Pe mediul NA peste 24 ore tulpina formează colonii de culoare albă-gri cu marginea filiformă și suprafața mată.

- 15 Caracteristica fiziologo-biochimică a tulpinii

Microorganism facultativ anaerob. Tulpina crește în limitele de temperatură de +5...+40°C. Temperatura optimă de creștere este de +28...+32°C. Valoarea optimă a pH-ului pentru dezvoltarea tulpinii este de 5,2. Tulpina produce catalază, hidrolizează amidonul și caseina, lichefiază gelatina. Formează acetilmetilcarbinol, lecitinază și urează. Nu descompune esculina și salicina. Nu formează acizi și gaze din maltoză, lactoză și zaharoze. Asimilează glucoza, manoza cu formarea de acizi. Nu formează sulfat de hidrogen și indol. Tulpina produce δ -endotoxine cu proprietăți insecticide.

Gradul de puritate al tulpinii

- 25 Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Phyllobius oblongus* L. (Thiery I., Frachon E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, p. 55-73. In: Lacey A.L. (eds) Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, London) colectate pe teritoriul Republicii Moldova. Pentru cultivare necesită utilizarea mediului agarizat T3. Gradul de puritate al tulpinii a fost verificat prin Reacția de Polimerizare în Lanț cu utilizarea primerilor specifici ITS (Internal Transcribed Spacer) 16S-23S și amplificarea porțiunii de genă CryI.

Exemplu de utilizare a invenției

- 30 Tulpina *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* este cultivată timp de o zi pe un agitator la temperatura de 30°C pe mediul nutritiv agarizat T3 cu următoarea componență (g/l): tripton – 3; triptoză – 2; extract de drojdii – 1,5; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 6,9; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; agar – 15; pH – 6,8. Celulele sunt precipitate, resuspendate în apă distilată și incubate pe un agitator circular pentru o noapte la 30°C, timp în care celulele lizează eliberând spori și cristale. Ulterior este determinată concentrația de spori și cristale de δ -endotoxină din lichidul cultural rezultat. Concentrația de spori este determinată după numărul de colonii în creștere pe mediul agarizat T3 după însămânțarea diluției. Prezența cristalelor este monitorizată cu ajutorul microscopiei prin contrast de fază. Prezența δ -endotoxinei este determinată prin reacția de precipitare, iar conținutul lor cantitativ - folosind ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

- 45 Se pregătește suspensia de contaminare în apă distilată cu diferite concentrații: $0,9 \cdot 10^9$ spori/ml; $0,9 \cdot 10^8$ spori/ml; $0,9 \cdot 10^7$ spori/ml; $0,9 \cdot 10^6$ spori/ml; $0,9 \cdot 10^5$ spori/ml. Cea mai efektivă dintre concentrațiile testate, pentru *Lymantria dispar* L. 1758, s-a dovedit a fi $0,9 \cdot 10^8$ spori/ml.

În experiență se utilizează dăunătorul pomilor fructiferi *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera).

- 50 Eficacitatea tulpinii de bacterii propuse a fost evaluată prin monitorizarea efectivului numeric al dăunătorilor colectați după prelucrare și cantitatea exemplarelor de insecte pierite după infestare.

Exemplul 1

- 55 Evaluarea activității insecticide a tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* a fost testată pe larvele provenite din populația naturală a speciei *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera, Erebidae). 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. În suspensiile pregătite sunt introduse frunze de măr de aproximativ

aceeași mărime, care sunt uscate la temperatura de 20°C și plasate în vase Petri. Pentru fiecare diluție sunt 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.

- 5 Activitatea biologică a tulpinii, exprimată în LC_{50} , a fost calculată după formula lui Kerber conform valorilor concentrațiilor de spori în diluțiile culturii bacteriene: $lg LC_{50} = lg C_M - \Sigma (\Sigma L - 0,5)$, unde C_M este concentrația maximă testată; Σ – logaritmul multiplicării diluției; ΣL – suma valorilor L pentru toate concentrațiile. Astfel o reducere cu 50% a efectivului dăunătorului *Lymantria dispar* L. poate fi obținută la aplicarea culturii bacteriene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* în concentrație de $1,392 \cdot 10^5$ spori/ml, în soluție de 0,9% NaCl.
- 10 Rezultatele sunt prezentate în tabel.

Tabel

Nivelul peirii dăunătorului *Lymantria dispar* L. după prelucrare cu suspensie din cultura bacteriană a tulpinilor de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

15

Nr.	Tulpina	Titrul sporilor, mld spori/ml	Activitatea insecticidă LC_{50} , spori/ml
1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	0,9	$1,392 \cdot 10^5$
2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> B159/252Bt	4,03	$2,377 \cdot 10^5$

- 20 Datele din tabel denotă că tulpina bacteriană propusă *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra lepidopterelor și poate fi utilizată ca agent biologic în controlul efectivului lor numeric. Tulpina este ecologic inofensivă, deoarece a fost extrasă din mediu natural, nu este patogenă pentru plante și organisme homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme noi, ceea ce exclude deterioarea ecosistemelor, cum se observă în cazul utilizării altor patogeni și preparate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. SU 769787 A1 1984.01.23
2. RU 2179392 C1 2002.02.20

(57) Revendicări:

Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CNMN-BB-04 în calitate de bioinsecticid pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*.

Șef secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2013 0057

(22) Data depozit: 2013.08.13

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE ZOOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

(54) **Titlul:** Tulpină de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* - bioinsecticid pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*

II. Clasificarea obiectului invenției:

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

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “bacillus thuringiensis”, “bacillus thuringiensis lymantria”

Int. Cl: *A01N 63/00* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01); *C12R 1/07* (2006.01); *A01P 7/04* (2006.01);

"Worldwide" (Espacenet): “bacillus thuringiensis”, “bacillus thuringiensis lymantria”

Int. Cl: *A01N 63/00* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01); *C12R 1/07* (2006.01); *A01P 7/04* (2006.01);

EA, CIS (Eapatis): “bacillus thuringiensis”, “bacillus thuringiensis lymantria”

Int. Cl: *A01N 63/00* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01); *C12R 1/07* (2006.01); *A01P 7/04* (2006.01);

SU (nonpublic): “bacillus thuringiensis”, “bacillus thuringiensis lymantria”

Int. Cl: *A01N 63/00* (2006.01); *C12N 1/20* (2006.01); *C12R 1/07* (2006.01); *A01P 7/04* (2006.01);

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538489>

Van Frankenhuyzen K., Milne R., Brousseau R., Masson L. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to defoliating forest Lepidoptera. J. Invertebr. Pathol., 1992, 59(2), p. 149-54.

Guz K., Bugla-Płoskońska G., Doroszkiewicz W. The occurrence, biodiversity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from the insect pest *Lymantria dispar* (Poland). Pol. J. Microbiol., 2009; 58(2), p. 155-61.

Van Frankenhuyzen K., Regniere J., Bernier-Cardou M. Response of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* at different ingested doses and temperatures. J. Invertebr. Pathol., 2008, 99(3), p. 263-274.

Kati H., Sezen K., Nalcacioglu R., Demirbag Z. A highly pathogenic strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in lepidopteran pests. J. Microbiol., 2007, 45(6), p. 553-557.

Van Frankenhuyzen K., Gringorten L., Gauthier D. Cry9Ca1 Toxin, a *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein with High Activity against the Spruce Budworm (*Choristoneura fumiferana*). Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63(10), p. 4132-4134.

Lee M.K., Curtiss A., Alcantara E., Dean D.H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(2), p. 583-586.

Fakharun Nisa Yunus, Rahat Makhdoom and Ghulam Raza. Synergism Between *Bacillus thuringiensis* Toxins Cry1Ac and Cry2Aa Against *Earias vitella* (Lepidoptera) Pakistan J. Zool., 2011, vol. 43(3), p. 575-580

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 4196 C1 2013.02.28	1
A	US 5976564 A 1999.11.02	1
A	US 5952547 A 1999.09.14	1
A	KR 20010002073 A 2001.01.05	1
A	JPH 02270805 A 1990.11.□5	1
A	CN 103160449 A 2013.06.19	1
A	RU 95108471 A 1997.02.20	1
A	CN 103087954 A 2013.05.08	1
A	MY 129859 A 2007.05.31	1
A	RU 2453595 C1 2012.06.20	1
A	US 2012065127 A1 2012.03.15	1
A	RU 2434939 C1 2011.11.27	1
A	CN 102154171 A 2011.08.17	1
A	MX 2010013641 A 2011.01.14	1
A	KR 20100103199 A 2010.09.27	1
A	RU 2347809 C1 2009.02.27	1
A	RU 2122791 C1 1998.12.10	1
A	RU 2108384 C1 1998.04.10	1
A	EA 000295 B1 1999.02.25	1
A	EA 199900041 A1 1999.02.25	1
A	WO 2008011584 A3 2008.06.28	1
A	WO 2008011574 A3 2008.08.14	1
A	US 6737273 B2 2004.05.18	1
A	US 20040058860 A1 2004.03.25	1
A	US 7511129 B2 2009.03.31	1
A, D	SU 769787 A1 1984.01.23	1
A, D, C	RU 2179392 C1 2002.02.20	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată

implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării	
18.07.2014	
Examinator	
LUPAȘCU Lucian	