MD 1285 Y 2018.09.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1285** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12R 1/80 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării menţiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenţie de scurtă durată, orice persoană poate face opoziţie la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2017 0143
(22) Data depozit: 2017.12.28

(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2018.09.30, BOPI nr. 9/2018

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD
(72) Inventator: SIRBU Tamara, MD
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD

MD 1285 Y 2018.09.30

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la microbiologie, şi anume la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20.

Mediul, conform invenţiei, conţine, în g/L: glucoză 30,0, $NaNO_3$ 1,0, KH_2PO_4 1,0,

2

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0, $CaCO_3$ 2,0, extract de drojdii 10,0 ml şi apă distilată, restul, având un pH iniţial de 6,0…6,2.

Revendicări: 1

(54) Nutrient medium for cultivation of *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 fungal strain

(57) Abstract:

1

The invention relates to microbiology, in particular to a nutrient medium for cultivation of *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 fungal strain.

The medium, according to the invention, comprises, in g/L: glucose 30.0, $NaNO_3$ 1.0, KH_2PO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, $CaCO_3$ 2.0, yeast extract 10.0 mL and distilled water, the rest, having an initial pH of 6.0…6.2.

Claims: 1

(54) Питательная среда для культивирования штамма грибов *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к микробиологии, а именно к питательной среде для культивирования штамма грибов *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20.

Среда, согласно изобретению, содержит, в г/л: глюкозу 30,0, $NaNO_3$ 1,0, KH_2PO_4 1,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0, $CaCO_3$ 2,0, дрожжевой экстракт 10,0 мл и дистиллированную воду, остальное, имея первоначальный pH 6,0…6,2.

П. формулы: 1

Descriere:
(Descrierea se publică în redacția solicitantului)

Invenţia se referă la microbiologie şi fitopatologie, in particular la um mediu de cultivare a tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, producătoare de biopreparat, care poate fi utilizat în protecţia biologică a plantelor.

Este cunoscut mediul nutritiv de cultivare submersă a micromicetei *Penicillium vermiculatum Dang. ВИЗР-24* – producătoare de vermiculen, preparat utilizat pentru combaterea agenţilor patogeni ai plantelor de cultură [1]. Acest preparat poate fi obţinut la cultivarea pe medii solide ce conţin pleavă şi seminţe de floarea-soarelui, in raport de 1:3, sau resturi de la curăţarea seminţelor de floarea-soarelui cu adaos de 0,3% humat de sodiu. Cultivarea durează 30 de zile. Componenţa mediului nutritiv lichid constă din săruri minerale şi melasă.

Dezavantajul acestui mediu constă în inaccesibilitatea componentelor pe care le conţine, durata lungă de cultivare a tulpinii, totodată preparatul solid ce conţine miceliul granular este greu de utilizat.

Pentru cultivarea micromicetelor *PV-3 Penicillium verrucosum şi PF-1 Penicillium funiculosum* – producătoare de biopreparate, se utilizează atât mediul Rudacov agarizat, cât şi lichid cu compoziţia (g/L): zaharoză 50,0, extract de porumb 10,0, KH_2PO_4 2,0, $MgSO_4$ 2,0, $FeSO_4$ 0,1, $CuSO_4$ 0,1, $MnSO_4$ 1, apă până la 1 litru [2]. Cultivarea pe mediul solid se efectuează timp de 6…15 zile, iar pe mediul lichid – timp de 4 zile, la temperatura de 30°C.

Dezavantajul constă în inaccesibilitatea extractului de porumb, de asemenea durata mare de cultivare pe mediul solid, numărul impunător de etape şi lucru anevoios de obţinere a biopreparatului.

In calitate de cea mai apropiată soluţie poare servi mediul nutritiv pentru cultivarea micromicetelor Waxman cu următoarea componenţă (g/L): glucoză 10,0, peptonă 5,0, KH_2PO_4 1,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5, apă distilată până la 1 litru, pH 5,5….6,0 [3]. Maximumul activităţii antifungice a biopreparatului obţinut la cultivarea tulpinii pe mediul menţionat s-a inregistrat in a 6-a zi de cultivare, la temperatura de 28…30°C, în condiţii de agitare continuă. Diametrul zonei de inhibiţie a fitopatogenilor: *Alt. alternata, Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Fusarium gibbosum, Botrytis cinerea* trataţi cu biopreparat constituie 25…30 mm.

Dezavantajul mediului proxim este preţul mare al peptonei, care intră în componenţa mediului, totodată pe acest mediu nu se realizează pe deplin potenţialul biosintetic al tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenţie constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare submersă a tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, care să asigure obţinerea unui biopreparat cu proprietăţi antifungice sporite şi reducerea duratei de cultivare.

Invenţia soluţionează problema prin aceea că se propune un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, care conţine, în g/L: glucoză 30,0, $NaNO_3$ 1,0, KH_2PO_4 1,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0, $CaCO_3$ 2,0, extract de drojdii 10,0 ml şi apă distilată, restul, având un pH iniţial de 6,0…6,2, care asigură biopreparatului obţinut un nivel al proprietăţilor antifungice de 1,2…1,5 ori mai înalt faţă de prototip pentru combaterea agenţilor patogeni: *Alt. alternata, Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Fusarium gibbosum, Botrytis cinerea.*

Rezultatul tehnic al invenţiei constă în reducerea duratei de cultivare a tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 cu 1 zi şi sporirea activităţii antifungice a biopreparatului obţinut de 1,2…1,5 ori faţă de prototip.

Datele prezentare reprezintă media a 10 probe.

Exemple de realizare a invenţiei

Exemplul 1

Tulpina *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 s-a cultivat in baloane Erlenmayer de 0,5 L in care s-au introdus paralel câte 100 ml mediu prototip şi mediul optimizat, în condiţii de agitare continuă (200 r.p.m.) la temperatura de 28…30°C timp de 7 zile. Biopreparatul reprezintă lichidul cultural obţinut la separarea mediului de cultivare de biomasa tulpinii prin filtrare. Culturile fitopatogene au fost însămânţate în cutii Petri pe mediul agarizat maţ-agar. La mijlocul cutiei s-a făcut o luncă de 0,8 mm, în care s-a introdus cate 1 ml de biopreparat.

Difuzia biopreparatului s-a produs la temperatura de 4°C timp de 24 ore, după care cutiile au fost amplasate in termostat, la temperatura de 30°C, pentru incubare. Peste 4 zile de incubare s-au efectuat măsurările zonei de inhibiţie a fitopatogenilor. Activitatea antifungică a biopreparatului obţinut prin cultivarea tulpinii în mediul proxim, cât şi în mediul optimizat a fost determinată în dinamică după diametrul zonei de inhibiţie a fitopatogenilor: *Alt. alternata, Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Fusarium gibbosum, Botrytis cinerea.*

Tabel

Dinamica activităţii antifungice a biopreparatului obţinut la cultivarea tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 pe diferite medii nutritive

Test culturi	Durata de cultivare, zile Diametrul zonei de inhibiţie, mm							
	Mediul prototip				Mediul optimizat			
	4	**5**	**6**	**7**	**4**	**5**	**6**	**7**
Alternaria alternata	20,3 ± 2,36	23,0 ± 1,13	**25,0 ± 1,21**	23,7 ± 1,35	25,5 ± 1,25	**30,3 ± 2,85**	28,7 ± 1,50	25,0 ± 1,25
Botrytis cinerea	12,5 ± 1,50	20,5 ± 1,25	**25, 0 ± 1,45**	22,0 ± 0,65	25,3 ± 1,85	**30, 0± 2,85**	25,0 ± 2,50	22,0 ± 2,0
Fusarium solani	14,7 ± 3,46	22,0 ± 1,35	**25,0 ± 1,35**	21, ± 1,35	28,5 ± 1,25	**35,0 ± 1,22**	30,3 ± 1,13	25,0 ± 1,0
Fusarium oxysporum	17,5 ± 1,50	25,3 ± 1,73	**26,5 ± 1,11**	25,0 ± 1,50	35,5 ± 1,35	**40,0 ± 1,33**	35,0 ± 2,25	25,0 ± 1,73
Fusarium gibbosum	16,0 ± 1,35	23,5 ± 1,25	**30,0 ± 1,13**	25,5 ± 1,13	25,7 ± 1,35	**36,0 ± 1,10**	30,3 ± 1,13	25,0 ± 1,0

Evaluând în dinamică activitatea antifungică a metaboliţilor tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, cultivată pe mediile proxim şi cel propus, s-a constatat că valoarea maximă a diametrului zonei de inhibiţie a fitopatogenilor testaţi în varianta proximă se obţine după 6 zile de cultivare, diametrul zonei de inhibiţie a fitopatogenilor variază în limitele 25…30 mm, iar in varianta cu mediul propus – după 5 zile de cultivare şi constituie 30…40 mm. Rezultatele obţinute demonstrează că utilizând mediul propus putem majora activitatea antifungică a metaboliţilor de 1,2…1,5 ori şi micşora durata de obţinere a biopreparatului cu 1 zi.

Exemplul 2

Tulpina *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 s-a cultivat in baloane Erlenmayer de 1 L, in care s-au introdus 200 ml mediu nutritiv, în condiţii de agitare continuă (200 r.p.m.) la temperatura de 28…30°C timp de 7 zile. Activitatea antifungică a biopreparatului, obţinut prin cultivarea tulpinii pe mediul proxim şi pe mediul optimizat, se determină în dinamică după 4…7 zile de cultivare, după diametrul zonei de inhibiţie a fitopatogenilor: *Alt. alternata, Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Fusarium gibbosum, Botrytis cinerea.*

Diametrul maxim al zonei de inhibiţie a fitopatogenilor testaţi la utilizarea biopreparatului obţinut în varianta proximă a fost înregistrat după 6 zile de cultivare a tulpinii şi constituie (mm): *Alt. alternata* 26,1 ± 1,31, *Fusarium solani* 25,0 ± 2,5, *Fusarium oxysporum* 27,5 ± 1,35, *Fusarium gibbosum* 28,5 ± 2,3, *Botrytis cinerea* 27,0 ± 1,25.

Diametrul zonei de inhibiţie a fitopatogenilor testaţi cu biopreparat obţinut la cultivarea *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 în varianta propusă timp de 5 zile, constituie (mm): *Alt. alternata* 32,5 ± 1,50, *Fusarium solani* 37,0 ± 1,35, *Fusarium oxysporum* 43,5 ± 2,50, *Fusarium gibbosum* 35,5 ± 1,50, *Botrytis cinerea* 33,3 ± 1,25.

La cultivarea tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN FD 20 in mediul propus, activitatea antifungică maximă a biopreparatului este obţinută cu o zi mai devreme fiind de 1,2…1,5 ori mai mare.

(56) Referinţe bibliografice citate in descriere:

1. RU 2322490 C1 2008.04.20
2. Маслиенко Л.В. Шипиевская Е.Ю., Асатурова А.М. Биологические особенности перспективных штаммов грибов антагонистов возбудителя фомопсиса. Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всеросийского научно-исследовательского института масличных культур. 2007, №2, p. 42-47
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под редакцией Егорова М.С. Москва, МГУ, 1995, p.208

(57) Revendicări:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, care conţine, în g/L: glucoză 30,0, $NaNO_3$ 1,0, KH_2PO_4 1,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0, $CaCO_3$ 2,0, extract de drojdii 10,0 ml şi apă distilată, restul, având un pH iniţial de 6,0…6,2.