



MD 1285 Z 2019.04.30

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

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

### (12) BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

(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 ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventator: SIRBU Tamara, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la microbiologie, și anume la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de funghi *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20.

Mediul, conform invenției, conține, în g/L: glucoză 30,0, NaNO<sub>3</sub> 1,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,0, CaCO<sub>3</sub> 2,0, extract de drojdii 10,0 ml și apă distilată, restul, având un pH inițial de 6,0...6,2.

Revendicări: 1

MD 1285 Z 2019.04.30

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

**(57) Abstract:**

<sup>1</sup>  
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<sub>3</sub> 1.0,

<sup>2</sup>  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, CaCO<sub>3</sub> 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:**

<sup>1</sup>  
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<sub>3</sub> 1,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0,

<sup>2</sup>  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,0, CaCO<sub>3</sub> 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)**

- 5 Invenția se referă la microbiologie și fitopatologie, în particular la un mediu de cultivare a tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, producătoare de biopreparat, care poate fi utilizat în protecția biologică a plantelor.
- Este cunoscut mediul nutritiv de cultivare submersă a micromicetei *Penicillium vermiculatum* Dang. *BH3P-24* – producătoare de vermiculen, preparat utilizat pentru
- 10 combaterea agenților patogeni ai plantelor de cultură [1]. Acest preparat poate fi obținut la cultivarea pe medii solide ce conțin pleavă și semințe de floarea-soarelui, în raport de 1:3, sau resturi de la curățarea semințelor de floarea-soarelui cu adaos de 0,3% humat de sodiu. Cultivarea durează 30 de zile. Componenta mediului nutritiv lichid constă din săruri minerale și melasă.
- 15 Dezavantajul acestui mediu constă în inaccesibilitatea componentelor pe care le conține, durata lungă de cultivare a tulpinii, totodată preparatul solid ce conține miceliul granular este greu de utilizat.
- Pentru cultivarea micromicetelor *PV-3 Penicillium verrucosum* și *PF-1 Penicillium funiculosum* – producătoare de biopreparate, se utilizează atât mediul Rudacov agarizat, cât și
- 20 lichid cu compoziția (g/L): zaharoză 50,0, extract de porumb 10,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0,  $\text{MgSO}_4$  2,0,  $\text{FeSO}_4$  0,1,  $\text{CuSO}_4$  0,1,  $\text{MnSO}_4$  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 și lucru anevoios de obținere a
- 25 biopreparatului.
- În calitate de cea mai apropiată soluție poate servi mediul nutritiv pentru cultivarea micromicetelor Waxman cu următoarea componentă (g/L): glucoză 10,0, peptonă 5,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5, apă distilată până la 1 litru, pH 5,5...6,0 [3]. Maximumul activității antifungice a biopreparatului obținut la cultivarea tulpinii pe mediul menționat s-a
- 30 înregistrat în a 6-a zi de cultivare, la temperatura de 28...30°C, în condiții de agitare continuă. Diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenilor: *Alt. alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium gibbosum*, *Botrytis cinerea* tratați cu biopreparat constituie 25...30 mm.
- Dezavantajul mediului proxim este prețul mare al peptonei, care intră în componența
- 35 mediului, totodată pe acest mediu nu se realizează pe deplin potențialul biosintetic al tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20.
- Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare submersă a tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, care să
- 40 asigure obținerea unui biopreparat cu proprietăți antifungice sporite și reducerea duratei de cultivare.
- Invenția soluționează problema prin aceea că se propune un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, care conține, în g/L: glucoză 30,0,  $\text{NaNO}_3$  1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,0,  $\text{CaCO}_3$  2,0, extract de drojdii 10,0
- 45 ml și apă distilată, restul, având un pH inițial de 6,0...6,2, care asigură biopreparatului obținut un nivel al proprietăților antifungice de 1,2...1,5 ori mai înalt față de prototip pentru combaterea agenților patogeni: *Alt. alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium gibbosum*, *Botrytis cinerea*.
- Rezultatul tehnic al invenției constă în reducerea duratei de cultivare a tulpinii
- 50 *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 cu 1 zi și sporirea activității antifungice a biopreparatului obținut de 1,2...1,5 ori față de prototip.
- Datele prezentare reprezintă media a 10 probe.
- Exemple de realizare a invenției
- Exemplul 1
- 55 Tulpina *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20 s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,5 L în care s-au introdus paralel câte 100 ml mediu prototip și mediul optimizat, în condiții de agitare continuă (200 r.p.m.) la temperatura de 28...30°C timp de 7 zile. Biopreparatul reprezintă lichidul cultural obținut la separarea mediului de cultivare de biomasa tulpinii prin filtrare. Culturile fitopatogene au fost însămânțate în cutii Petri pe mediul agarizat maș-agar. La mijlocul cutiei s-a făcut o luncă de 0,8 mm, în care s-a introdus câte 1 ml de biopreparat.

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

Tabel

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

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

10

Evaluând în dinamică activitatea antifungică a metaboliților tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, cultivată pe mediile proxim și cel propus, s-a constatat că valoarea maximă a diametrului zonei de inhibiție a fitopatogenilor testați în varianta proximă se obține după 6 zile de cultivare, diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenilor variază în limitele 25...30 mm, iar în varianta cu mediul propus – după 5 zile de cultivare și constituie 30...40 mm. Rezultatele obținute demonstrează că utilizând mediul propus putem majora activitatea antifungică a metaboliților de 1,2...1,5 ori și micșora durata de obținere a biopreparatului cu 1 zi.

15

## Exemplul 2

20

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

25

Diametrul maxim al zonei de inhibiție a fitopatogenilor testați la utilizarea biopreparatului obținut în varianta proximă a fost înregistrat după 6 zile de cultivare a tulpinii și 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.

30

Diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenilor testați cu biopreparat obținut 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.

35

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

**(56) Referințe bibliografice citate în 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 Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2007, №2, р. 42-47
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под редакцией Егорова М.С. Москва, МГУ, 1995, р.208

**(57) Revendicări:**

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Penicillium corylophilum* CNMN-FD-20, care conține, în g/L: glucoză 30,0, NaNO<sub>3</sub> 1,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,0, CaCO<sub>3</sub> 2,0, extract de drojdii 10,0 ml și apă distilată, restul, având un pH inițial de 6,0...6,2.