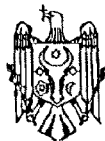




MD 1071 Y 2016.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1071** (13) **Y**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/085* (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE  
DE SCURTĂ DURATĂ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului                                                                                                  |                                                                                         |
| (21) Nr. depozit: s 2015 0150<br>(22) Data depozit: 2015.11.10                                                                                                                                                                                                                           | (45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:<br>2016.09.30, BOPI nr. 9/2016 |
| (71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD<br>(72) Inventatori: BATIR Ludmila, MD; SLANINA Valerina, MD; SIRBU Tamara, MD<br>(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD |                                                                                         |

(54) Procedeu de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică.

Procedeu, conform invenției, prevede cultivarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 pe un mediu nutritiv în decurs de 48 ore la temperatura de 28...30°C, resuspendarea într-un mediu

2  
constituit din lapte degresat și 12% de zaharoză cu un titru de  $10^{-8}$ ... $10^{-9}$ , congelarea rapidă la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de + 4°C.

Rezultatul constă în majorarea activității antifungice a tulpinii după păstrare.

Revendicări: 1

MD 1071 Y 2016.09.30

**(54) Process for conservation of *Bacillus cereus* var. *fluorescens* strain with antifungal activity**

**(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biotechnology, particularly to a process for conservation of *Bacillus cereus* var. *fluorescens* strain with antifungal activity.

The process, according to the invention, provides for the cultivation of *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 strain on a nutrient medium for 48 hours at a temperature of 28...30°C, resuspension in a medium

2  
consisting of skim milk and 12% of sucrose with a titer of  $10^{-8} \dots 10^{-9}$ , rapid freezing at a temperature of -20°C, lyophilization and storage at a temperature of +4°C.

The result consists in increasing the antifungal activity of the strain after storage.

Claims: 1

**(54) Способ консервирования штамма *Bacillus cereus* var. *fluorescens* с антифунгальной активностью**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу консервирования штамма *Bacillus cereus* var. *fluorescens* с антифунгальной активностью.

Способ, согласно изобретению, предусматривает культивирование *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 на питательной среде в течение 48 часов при температуре 28...30°C, ресуспендирование

2  
в среде, состоящей из обезжиренного молока и 12% сахарозы с титром  $10^{-8} \dots 10^{-9}$ , быстрое замораживание при температуре -20°C, лиофилизацию и хранение при температуре +4°C.

Результат состоит в повышении антифунгальной активности штамма после хранения.

П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică. La un procedeu care duce la stimularea activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* asupra diferitor tulpini de fungi fitopatogeni ca: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger* ce provoacă diferite boli la plantele de cultură. Datorită capacității de sporire a activității antifungice, procedeul poate fi utilizat la conservarea microorganismelor pe un termen îndelungat cu aplicarea acestora ca agenți de protecție a plantelor de cultură de infectarea cu fitopatogeni.

Afectarea plantelor de cultură de către fitopatogeni duce la scăderea productivității lor, la micșorarea recoltei, precum și la diminuarea calității produsului obținut. Utilizarea microorganismelor în calitate de agenți cu proprietăți antimicrobiene pronunțate asupra fitopatogenilor permite atât majorarea productivității plantelor, cât și îmbunătățirea calității produsului.

În prezent este cunoscut un procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 asupra fungilor fitopatogeni în urma liofilizării, utilizând ca mediu protector succinat de Na + 12% zaharoză, în rezultatul căruia, după 6 ani de păstrare, zonele de inhibiție a patogenilor au atins valori de 15,0...25,0 mm, în dependență de test-cultura studiată [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că proprietățile antifungice sunt slabe și mai puțin pronunțate după păstrarea îndelungată.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, în urma liofilizării, cu utilizarea unui mediu protector ce asigură stimularea proprietăților antifungice asupra fitopatogenilor, după 6 ani de păstrare.

Procedeul revendicat constă în conservarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 cu capacitate antifungică prin liofilizarea acesteia, utilizând mediul de protecție lapte degresat + 12% zaharoză. Zonele de inhibiție a creșterii fitopatogenilor, după 6 ani de la conservare, ating valori de 31,0 mm pentru *Fusarium oxysporum*, 33,7 – *Fusarium solani*, 30,7 – *Alternaria alternata*, 28,7 – *Botrytis cinerea* și 24,3 mm – *Aspergillus niger*.

Procedeul de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică prevede cultivarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 pe un mediu nutritiv în decurs de 48 ore la temperatura de 28...30°C, resuspendarea într-un mediu constituit din lapte degresat și 12% de zaharoză cu un titru de  $10^{-8}$ ... $10^{-9}$ , congelarea rapidă la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de +4°C.

Rezultatul constă în majorarea activității antifungice a tulpinii după păstrare, și anume stimularea evidentă a proprietăților antifungice asupra fitopatogenilor *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger* după 6 ani de păstrare, acestea fiind mai înalte față de soluția cea mai apropiată. Zonele de inhibiție a creșterii fitopatogenilor obținute în rezultatul utilizării tulpinii liofilizate, cu utilizarea mediului protector succinat de Na + 12% zaharoză (soluția cea mai apropiată), variază de la 15,0...25,0 mm pentru tulpinile *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. alternata*, *B. cinerea* și *A. niger*, iar zona de inhibiție determinată cu utilizarea procedurii propuse în invenție variază între 24,3...33,7 mm, ceea ce depășește de până la 1,62 ori caracteristicile analoage obținute conform celei mai apropiate soluții.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că, în calitate de mediu protector pentru liofilizarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 se utilizează lapte degresat + 12% zaharoză. Proprietățile antifungice evidente sunt asigurate datorită resuspendării tulpinii în mediul dat, care asigură un efect protector față de șocurile osmotice și termice și nu permite acestora de a influența negativ sinteza metaboliților cu activitate antifungică.

Exemplu de realizare a invenției

Se prepară mediul nutritiv agarizat King B cu următorul conținut al ingredientelor: peptonă – 20,0 g; glicerină – 15,0 mL;  $K_2HPO_4$  – 1,5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,5 g; agar – 15,0 g; apă distilată până la 1,0 litru; pH-ul = 7,0 – 7,2. Pe mediul preparat, în tuburi înclinate, se reînsămânțează tulpina *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, după 48 ore de

incubare la +28...30°C, cultura se resuspendă în mediul protector lapte degresat + 12% zaharoză până la titrul de  $10^{-8}$ ... $10^{-9}$ , se repartizează câte 1,0...2,0 mL de suspensie în flacoane și se congelează rapid la -20°C, după care probele se liofilizează. Probele liofilizate sunt sigilate și plasate în frigider la temperatura de +4°C. După 6 ani de conservare în stare liofilizată tulpina se reînsămânțează pentru a determina activitatea antifungică.

Paralel se pregătesc culturile de fungi fitopatogeni care sunt inoculate pe mediul Czapek cu următoarea componență (g/L): zaharoză – 30,0; NaNO<sub>3</sub> – 3,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub> – 0,01; agar – 20,0; apă distilată până la 1,0 litru; pH-ul = 7,0...7,2. Suspensia de spori a fungilor fitopatogeni cu titrul  $10^{-7}$ ... $10^{-8}$  se reînsămânțează submers în plăcile Petri.

Determinarea activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 după 6 ani de la liofilizare pe mediul protector lapte degresat + 12% zaharoză a fost efectuată conform metodei de difuziune a metaboliților prin utilizarea discurilor de geloză. În calitate de culturi de referință în experimentul *in vitro* au fost folosite tulpinile fitopatogene de micromicete: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger*. După 4...5 zile de incubare se măsoară zonele de inhibiție aparente în jurul discurilor de geloză.

Proprietățile antifungice pronunțate depistate în urma elaborării procedurii de conservare și stimulare a activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 asupra fitopatogenilor prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de microorganisme cu capacitate antifungică pronunțată, cu utilizarea acestora ca agenți de prevenire și protejare a plantelor de cultură.

Rezultatele studiului activității antifungice după 6 ani de conservare, în urma liofilizării tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 utilizand ca mediu protector laptele degresat + 12% zaharoză, sunt prezentate în tabel, care relevă o activitate mai sporită față de cea mai apropiată soluție. Astfel, datele experimentale obținute demonstrează că procedeul revendicat manifestă activitate antifungică mai sporită față de fitopatogenii *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger*, care depășește de până la 1,62 ori caracteristicile analoage ale procedurii descris în cea mai apropiată soluție.

Tabel

Activitatea antifungică a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, după 6 ani de conservare în stare liofilizată conform procedurii propus în invenție și celei mai apropiate soluții

|                                      | Metoda utilizată                                     | Zona de inhibiție a fungilor fitopatogeni (mm) |                        |                             |                         |                          |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                                      |                                                      | <i>Fusarium oxysporum</i>                      | <i>Fusarium solani</i> | <i>Alternaria alternata</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| Conform celei mai apropiate soluții  | Liofilizarea pe mediul succinat de Na + 12% zaharoză | 23,0±1,1                                       | 25,0±1,1               | 19,3±1,3                    | 23,7±1,7                | 15,0±1,1                 |
| Conform soluției propuse în invenție | Liofilizarea pe mediul lapte degresat + 12% zaharoză | 31,0±1,1                                       | 33,7±1,7               | 30,7±1,3                    | 28,7±2,4                | 24,3±1,7                 |

Datele din tabel demonstrează că zonele de inhibiție determinate conform procedurii propus în invenție sunt mai mari și le depășesc de până la 1,62 ori pe cele descrise în cea mai apropiată soluție.

Proprietățile depistate ale tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, liofilizată conform procedurii revendicat, prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de preparate cu acțiune antifungică pronunțată asupra fungilor fitopatogeni – dăunători ai plantelor de cultură.

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. Batir L., Slanina V., Sarbu T., Chiselița O. Activitatea antifungică a unor tulpini autohtone de microorganisme după 3 și 6 ani de conservare în stare liofilizată. Revista de Proprietate Intelectuală Intellectus, nr. 3, 2015, p. 96-104

**(57) Revendicări:**

Procedeu de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică, care prevede cultivarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 pe un mediu nutritiv în decurs de 48 ore la temperatura de 28...30°C, resuspendarea într-un mediu constituit din lapte degresat și 12% de zaharoză cu un titru de  $10^{-8}$ ... $10^{-9}$ , congelarea rapidă la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de + 4°C.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ală

Examinator:

DUBĂSARU Nina

Redactor:

LOZOVANU Maria

**RAPORT DE DOCUMENTARE**

**I. Datele de identificare a cererii**

(21) Nr. depozit: s 2015 0150 (32) Data de prioritate recunoscută:  
 (22) Data depozit: 2015.11.10 Raport de documentare internațională: ☐ da  
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**  
 (54) **Titlul: Procedeu de stimulare a activității antifungale a tulpinii *Bacillus Cereus* var. *Fluorescens* CNMN-BB-07 asupra fitopatogenilor**

**II. Clasificarea obiectului invenției:**

(51) **Int.Cl:** *C12N 1/04* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/085* (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): C12N 1/04

C12N1/20  
 C12R1/085

conservare  
 liofilizare  
 Bacillus cereus  
 antifungic

**"Worldwide" (Espacenet):**

**EA, CIS (Eapatis):**

C12N 1/04  
 C12N1/20  
 C12R1/085

консервирование  
 лиофилизация  
 Bacillus cereus  
 антифунгальный

**SU (nonpublic):**

Alte BD –

**IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate**

[http://discollection.ru/article/15112013\\_145290\\_pozdnjakova/5](http://discollection.ru/article/15112013_145290_pozdnjakova/5)

**V. Documente considerate a fi relevante**

|                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                            |                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Categoria*                                                                                                                                                                                                   | Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente                                                                                                                                           | Numărul revendicării vizate |
| A, D, C                                                                                                                                                                                                      | Batir L., Slanina V., Sarbu T., Chiselița O. Activitatea antifungică a unor tulpini autohtone de microorganisme după 3 și 6 ani de conservare în stare liofilizată. Revista de Proprietate Intelectuală Intellectus. nr.3, 2015, p. 96-104 | 1                           |
| A                                                                                                                                                                                                            | UA 49390 C2 2004.06.15                                                                                                                                                                                                                     | 1                           |
| A                                                                                                                                                                                                            | RU 2514023 C1 2014.04.27                                                                                                                                                                                                                   | 1                           |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                            |                             |
| <b>* categoriile speciale ale documentelor citate:</b>                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                            |                             |
| <b>A</b> – document care definește stadiul anterior general                                                                                                                                                  | <b>T</b> – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția           |                             |
| <b>X</b> – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur                    | <b>E</b> – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată                                                                                                                                       |                             |
| <b>Y</b> – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie | <b>D</b> – document menționat în descrierea cererii de brevet                                                                                                                                                                              |                             |
| <b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare                                                                               | <b>C</b> – document considerat ca cea mai apropiată soluție                                                                                                                                                                                |                             |
|                                                                                                                                                                                                              | <b>&amp;</b> – document, care face parte din aceeași familie de brevete                                                                                                                                                                    |                             |
| <b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate                                                                                                                  | <b>L</b> – document citat cu alte scopuri                                                                                                                                                                                                  |                             |
|                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                            |                             |
| Data finalizării documentării 2016.03.24                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                            |                             |
| Examinator DUBĂSARU Nina                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                            |                             |