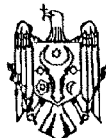




MD 1106 Y 2016.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1106** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/125 (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 2016 0087 (22) Data depozit: 2016.07.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.12.31, BOPI nr. 12/2016
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ȘUBINA Victoria, MD; VOLOȘCIUC Leonid, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la microbiologie, și anume la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține, g/L: sulfat de amoniu – 1,4, fosfat de potasiu monobazic – 1,5, fosfat de sodiu dibazic – 2,5, clorură de sodiu – 0,5, glucoză – 2,0, drojdii

2
uscate – 4,0, citrat de sodiu – 0,25, triptonă – 0,25, glicerină – 2,0 ml, apă – restul, având un pH de 5,5...6,0.

Rezultatul invenției constă în sporirea creșterii și a activității antifungice a culturii bacteriene.

Revendicări: 1

MD 1106 Y 2016.12.31

(54) Nutrient medium for cultivation of *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 strain

(57) Abstract:

1

The invention relates to microbiology, namely to a nutrient medium for cultivation of *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 strain.

The nutrient medium, according to the invention, comprises, g/L: ammonium sulfate – 1.4, monobasic potassium phosphate – 1.5, dibasic sodium phosphate – 2.5, sodium chloride – 0.5, glucose – 2.0, dry yeast – 4.0,

2

sodium citrate – 0.25, tryptone – 0.25, glycerol – 2.0 ml, water – the rest, having a pH of 5.5...6.0.

The result of the invention is to improve the growth and antifungal activity of the bacterial culture.

Claims: 1

(54) Питательная среда для культивирования штамма *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к микробиологии, а именно к питательной среде для культивирования штамма *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09.

Питательная среда, согласно изобретению, содержит, г/л: сульфат аммония – 1,4, калий фосфорнокислый однозамещенный – 1,5, натрий фосфорнокислый двузамещенный – 2,5,

2

хлорид натрия – 0,5, глюкозу – 2,0, дрожжи сухие – 4,0, цитрат натрия – 0,25, триптон – 0,25, глицерин – 2,0 мл, воду – остальное, с pH 5,5...6,0.

Результат изобретения состоит в повышении роста и антифунгальной активности бактериальной культуры.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie, și anume la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09.

5 Invenția se referă la domeniul microbiologiei, în particular la elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea microorganismelor care pot fi utilizate pentru protecția biologică a plantelor.

Este cunoscut mediul nutritiv M9 cu compoziția (g/L): clorură de amoniu – 1,0, fosfat monobazic de potasiu – 3,0, fosfat dibazic de sodiu – 6,0, sulfat de magneziu - 0,25, glucoză - 2,0, apă - restul [1].

10 Dezavantajul acestui mediu nutritiv constă în creșterea lentă a boimasei, calitatea și activitatea antifungică redusă a bacteriilor cultivate.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv care să accelereze creșterea biomasei și să stimuleze activitatea antifungică a culturii.

15 Mediul nutritiv, conform invenției, conține, g/L: sulfat de amoniu – 1,4, fosfat de potasiu monobazic – 1,5, fosfat de sodiu dibazic – 2,5, clorură de sodiu – 0,5, glucoză – 2,0, drojdii uscate – 4,0, citrat de sodiu – 0,25, triptonă – 0,25, glicerină – 2,0 ml, apă – restul, având un pH de 5,5...6,0.

20 Rezultatul invenției constă în sporirea creșterii și a activității antifungice a culturii bacteriene.

Exemplu de realizare a invenției

Obiectul cercetării a fost o tulpină activă a bacteriei *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09, izolată din rizosfera plantelor de tomate. În prima fază a cultivării tulpinii a fost 25 utilizat mediul M9 cu următoarea compoziție, în g/L: clorură de amoniu – 1,0, fosfat monobazic de potasiu – 3,0, fosfat dibazic de sodiu – 6,0, sulfat de magneziu - 0,25, glucoză - 2,0, apa - restul. Pentru a îmbunătăți proprietățile de creștere ale mediului nutritiv și pentru sporirea activității antifungice a culturii bacteriene *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 în mediul nutritiv suplimentar au fost introduse următoarele 30 componente, în g/L: drojdii uscate – 4,0, citrat de sodiu – 0,25, triptonă – 0,25, glicerină – 2,0.

Bacteriile tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 au fost cultivate în flacoane agitate conținând 250 ml de medii nutritive (mediul optimizat și mediul conform celei 35 mai apropiate soluții). Cultivarea a fost realizată la temperatura de 28°C, pe parcursul a 4 zile. Probele au fost prelevate la 2, 3 și 4 zile de cultivare. Determinarea titrului culturii bacteriene a fost realizată prin diluții limitatoare [Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Москва, 1995, 224 p]. Datele privind titrul culturii *Bacillus subtilis* CNM-BB-09 sunt prezentate în tabelul 1. Pentru a determina activitatea antifungică în calitate de cultură de testare a fost aleasă 40 *Alternaria alternata* utilizand metoda de disc de hartie [Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. Москва, 2004, 528 p].

Tabelul 1

45 Numărul de unități formatoare ale tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 după 2, 3, 4 zile de cultivare

Mediul nutritiv	Durata de cultivare, zile		
	2	3	4
M9 (cea mai apropiată soluție)	$1,3 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^9$
M9+ citrat de sodiu	$1,3 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$	$4,8 \cdot 10^9$
M9+ drojdii uscate	$5,9 \cdot 10^9$	$4,9 \cdot 10^9$	$4,1 \cdot 10^9$
M9+ triptonă	$7,1 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^9$	$5,7 \cdot 10^9$
M9+ glicerină	$1,3 \cdot 10^8$	$9,2 \cdot 10^8$	$5,7 \cdot 10^9$
Mediul propus (invenție)	$7,5 \cdot 10^9$	$8,9 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^{10}$

Datele privind activitatea antifungică a tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 sunt prezentate în tabelul 2 și 3.

Tabelul 2

5 Activitatea antifungică a tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 după 2 zile de cultivare

Mediul nutritiv	Concentrațiile de suspensie bacteriană, diametrul zonei de inhibiție, mm					
	5,0%	3,0%	1,0%	0,5%	0,2%	0,1%
M9 (cea mai apropiată soluție)	5(0)*	0(3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
M9+ citrat de sodiu	10,3(2,6)	10(3)	8(2)	8(2)	7(3)	7(3)
M9+ drojdii uscate	15(6)	14(7)	15(6)	12(5)	10(5)	8(3)
M9+ triptonă	16,3(5)	15(5)	15(10)	13(10)	11(7)	10(5)
M9+ glicerină	11,6(9)	11(5)	9(5)	9(3)	8,5(3,5)	5,5(3)
Mediul propus (invenție)	18,2(5,6)	17,7(8,8)	15(10)	15(10)	15(2)	12(2)

De exemplu:

- 10 5(0)*, - 5 (cifra din fața parantezei) diametrul zonei de creștere a agentului patogen complet suprimată,
- (0) (cifra din paranteză) diametrul zonei de liză a miceliului agentului patogen

Tabelul 3

15 Activitatea antifungică a tulpinii bacteriene *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 după 4 zile de cultivare

Mediul nutritiv	Concentrațiile de suspensie bacteriană				
	3,0%	1,0%	0,5%	0,2%	0,1%
M9 (cea mai apropiată soluție)	5(1,2)	3(0)	0(0)	0(0)	0(0)
M9+ citrat de sodiu	12(5)	9(4,5)	10(4)	8(3)	8(3)
M9+ drojdii uscate	15(5)	15(5)	12(2)	9(5)	8(3)
M9+ triptonă	15(5)	10(5)	10(4)	8(3)	8(3)
M9+ glicerină	15(4)	9(3)	9(3)	7(3)	6,5(3)
Mediul propus (invenție)	18,3(4,8)	16(5,1)	16(4,2)	14(2,1)	10(3)

- 20 Titrul maxim al tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09 pe mediul cunoscut a fost observat în ziua a 4-a de cultivare atingând valoarea de $2,6 \times 10^9$, în timp ce pe mediul din invenția propusă, după două zile de cultivare titrul culturii a atins valoarea de $7,5 \times 10^9$, iar în ziua a patra de $1,7 \times 10^{10}$, ceea ce depășește de 6,5 ori titrul obținut pe mediul din cea mai apropiată soluție.

- 25 Astfel, în zonele de inhibare a creșterii miceliului format de patogen activitatea antifungică a culturii bacteriene a depășit-o pe cea a culturii obținute pe mediul din cea mai apropiată soluție în toate concentrațiile testate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Маслак Д.В., Феклистова И.Н., Гринева И.А. и др. Активность целлюлолитического комплекса индуцированных мутантов *Bacillus subtilis*. Труды БГУ, 2015, том 10, часть 1, Микробиология, р. 83-89

(57) Revendicări:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09, care conține, g/L: sulfat de amoniu – 1,4, fosfat de potasiu monobazic – 1,5, fosfat de sodiu dibazic – 2,5, clorură de sodiu – 0,5, glucoză – 2,0, drojdii uscate – 4,0, citrat de sodiu – 0,25, triptonă – 0,25, glicerină – 2,0 ml, apă – restul, având un pH de 5,5...6,0.

Şef Direcție Brevete:

GUŞAN Ala

Examinator:

DUBĂSARU Nina

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2016 0087

(32) Data de prioritate recunoscută:

(22) Data depozit: 2016.07.04

Raport de documentare internațională: ☐ da

(67) Numărul cererii transformate și data transformării:

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

(54) **Titlul:** Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis* CNMN-BB-09

II. Clasificarea obiectului invenției:

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

C12R 1/125 (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 1/20

C12R 1/125

Mediu nutritiv

Bacillus

"Worldwide" (Espacenet):

EA, CIS (Eapatis):

C12N 1/20

C12R 1/125

Питательная среда

Bacillus

SU (nonpublic):

Alte BD –

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

www.google.com

http://www.bio.bsu.bv/genetics/maximovanp_ru.html

<http://mbio.bas-net.by/wp-content/uploads/2015/09/thesis-InMi-2015.pdf>

<http://www.bio.bsu.by/proceedings/articles/2015-10-1-82-89.pdf>

http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/ru/med/lik/pitn/%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F.%20%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F.%20%D0%B8%20%D0%B8%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F/2/03%20%D0%9F%D0%B8%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B5%20%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%8B%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F.%20%D0%BA%D1

<http://www.bestreferat.ru/referat-189428.html>

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	Д.В. Маслак, И.Н. Феклистова, И.А. Гринева, Т.Л. Скакун, Л.Е. Садовская, Н.П. Максимова. .Активность целлюлолитического комплекса индуцированных мутантов <i>Bacillus subtilis</i> . Труды БГУ. 2015, том 10, часть 1, Микробиология, р. 83-89	1
A	MD 727 F1 1997.05.31	1
A	MD 4304 B1 2014.09.30	1
A	KZ 26835 A4 2013.05.15	1
A	RU 2571945 C1 2015.12.27	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 implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
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 2016.09.12

Examinator DUBĂSARU Nina