



MD 2341 B2 2003.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2341** ⁽¹³⁾ **B2**
(51) **Int. Cl.⁷**: C 12 N 1/20

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2001 0233 (22) Data depozit: 2001.07.24 (41) Data publicării cererii: 2003.02.28, BOPI nr. 2/2003	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.12.31, BOPI nr. 12/2003
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: EMNOVA Ecaterina, MD; RUDIC Valeriu, MD; MERENIUC Gheorghe, MD; CEPOI Liliana, MD; SLANINA Valerina, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Mediu nutritiv pentru cultivarea pseudomonadelor fluorescente**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la biotehnologie, în special la mediile nutritive pentru cultivarea pseudomonadelor fluorescente - producători de substanțe biologice active, utilizate în agricultură.

Mediul nutritiv conține peptonă, glicerină, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, extract din cianobacteria *Spirulina platensis* și apă, având următorul raport al ingredientelor, g/L:

peptonă	10,00
glicerină	5,00

5	K ₂ HPO ₄	0,75
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
	extract din cianobacteria <i>Spirulina platensis</i>	0,05...0,10
	apă	până la 1 L.
10	Rezultatul invenției constă în sporirea cantității de siderofor sintetizat de către bacteriile <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	
	Revendicări: 1	

MD 2341 B2 2003.12.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în special la mediile nutritive pentru cultivarea pseudomonadelor fluorescente – producători de substanțe biologice active, utilizate în agricultură.

- 5 Este cunoscut mediul nutritiv cu acid succinic [1], ce se utilizează pentru cultivarea pseudomonadelor fluorescente și sinteza sideroforilor, care conține (în g/L):

K ₂ HPO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2
acid succinic	4,0
apă	până la un L

pH este adus până la 7,0 cu hidroxid de sodiu înainte de sterilizare.

Dezavantajul acestui mediu este prețul înalt al acidului succinic și nivelul nesatisfăcător de sinteză a substanței cu proprietate antimimicotică - sideroforului.

- 10 De asemenea este cunoscut mediul standard lichid - King B - pentru cultivarea pseudomonadelor fluorescente [2], care conține (în g/L):

peptonă	20,0
glicerină	10,0
K ₂ HPO ₄	1,5
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1,5
apă	până la un L
valoarea pH	7,2.

Dezavantajul mediului nutritiv menționat este nivelul scăzut de sinteză a sideroforului și prețul de cost înalt al produsului final.

Problema pe care o rezolvă invenția dată constă în lărgirea asortimentului de medii nutritive și sporirea cantității de siderofor sintetizat de către bacteriile *Pseudomonas fluorescens*.

- 15 Se propune un mediu nutritiv nou având următoarea componență și raport al ingredientelor (în g/L):
peptonă - 10,0; glicerină - 5,0; K₂HPO₄ - 0,75; MgSO₄ • 7H₂O - 0,75; extract din cianobacteria *Spirulina platensis* - 0,05...0,1; apa până la 1 L; pH 7,2.

Rezultatul invenției constă în sporirea cantității de siderofor sintetizat de către bacteriile *Pseudomonas fluorescens* cu 30...34% și micșorarea prețului de cost al produsului final cu 50%.

- 20 Pregătirea extractului din cianobacteria *Spirulina platensis*

Cultivarea spirulinei s-a efectuat pe mediul nutritiv mineral nr. 16 (Gromov, Titova, 1983) prin iluminare constantă de 12...15 mii ergi/cm² în primele zile și de 18...20 mii ergi/cm² în următoarele zile, în regim termic de 34...36°C și agitare periodică. În a 5-a zi de cultivare biomasa de spirulină se separă prin filtrare de lichidul cultural, se spală cu soluție de 1,5% de acetat de amoniu, se resuspendează în apă în calcul de 10,0 g/L și se tratează cu ultrasunet de 22 kHz câte 30 s de 5 ori la intervale de 60 s. Supernatantul transparent obținut este decantat în condiții aseptice în flacoane.

- 25 *Exemplul 1.* Mediul propus (50 ml), ce conține 0,05 g/L extract din cianobacteria *Spirulina platensis*, este inoculat cu bacteria *Pseudomonas fluorescens* CNM PFB-01. Mediul standard King B și mediul King B diluat de 2 ori constituie varianta martor. După cultivarea (48 h) în termostat (28°C) cu aerare (200 rot/min) acumularea sideroforului este înregistrată spectrofotometric. Valoarea densității optice la lungimea de undă de 400 nm (DO₄₀₀) după separarea sedimentului celulelor prin centrifugare (5000 rot/min - 10 min) este măsura condițională a conținutului sideroforului ce a fost sintetizat și eliminat în mediu. Adaosul autentic în valoare DO₄₀₀ în prezența extractului din cianobacteria *Spirulina platensis* constituie 30% față de martor - mediul King B diluat (1:1).

- 35 *Exemplul 2.* Mediul propus (50 ml), ce conține 0,1 g/L extract din cianobacteria *Spirulina platensis*, este inoculat cu bacteria *Pseudomonas fluorescens* CNM PFB-01. Se repetă toate operațiile din exemplul 1. Adaosul autentic în valoare DO₄₀₀ în prezența extractului din cianobacteria *Spirulina platensis* constituie 34% față de martor - mediul King B diluat (1:1).

MD 2341 B2 2003.12.31

4

Tabel

Medii nutritive	Conținutul sideroforului în unități condiționale, densitatea optică - DO ₄₀₀	% față de martor M1	% față de martor M2	P Veridicitatea față de martori
Mediul King B (M1) soluția cea mai apropiată	2,1±0,6	100		
Mediul King diluat de 2 ori (M2)	4,3±0,2		100	
Mediul conform invenției: • 0,05 g/L • 0,1 g/L	5,6±0,08 5,8±0,4	267 276	130 134	<0,01 <0,05

5 În așa fel, utilizarea mediului nutritiv propus cu extract de spirulină contribuie la sinteza și acumularea sporită în mediu a sideroforului.

10 (57) Revendicare:

Mediu nutritiv pentru cultivarea pseudomonadelor fluorescente ce include peptonă, glicerină, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O și apă, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține extract din cianobacteria *Spirulina platensis*, având următorul raport al ingredientelor, g/L:

15	peptonă	10,00
	glicerină	5,00
	K ₂ HPO ₄	0,75
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
	extract din cianobacteria <i>Spirulina platensis</i>	0,05...0,10
20	apă	până la 1L.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Meyer J.M., Abdallah M.A. The fluorescent pigment of pseudomonas fluorescens : biosynthesis, purification and physico-chemical properties. Journal of Gen. Microbiol., 1978, v. 107, p. 319 – 328
2. King E.O., Ward M.K., Runey D.E. Two simple media for the demonstration of piocyanin and fluorescein. Journal of Lab. 1954, v. 44. p. 301-307

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0233	
(22) Data depozit: 2001.07.24	
(51) ⁷ : C 12 N 1/20 (54) Titlul : Mediu nitritiv pentru cultivarea pseudomonadelor fluorescente (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : a) limba română: mediu nutritive, cultivarea pseudomonadelor fluorescente b) limba engleză: medium nutrition, cultivation pseudomonas fluorescens	
I. Minimul de documente consultate (sistemul clasificării și indici de clasificare Int. Cl.- 7)	
Int. Cl. ⁷ C 12 N 1/20	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
1. Meyer J.M., Abdallah M.A. The fluorescent pigment of pseudomonas fluorescens : biosynthesis, purification and physico-chemical properties. Journal of Gen. Microbiol., 1978, v. 107. P. 319 – 328. 2. King E.O., Ward M.K., Runey D.E. Two simple media for the demonstration of piocyanin and fluorescein. Journal of Lab. 1954. v. 44. p. 301-307.	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
1. MD 2. ФИПС, RU 3. Espacenet The Euroăpen Patent Office 4. РЖ ВИНТИ «Биология», «Физико-химическая биология и биотехнология»	

a 2001 0233

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU 1299142 A1	1
A	SU 1663023 A1 1991, 1991, 07.15	1
☐ Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
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
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2003.10.08
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr. depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4