



MD 1072 Z 2017.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1072** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/38 (2006.01)

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

(21) Nr. depozit: s 2015 0151 (22) Data depozit: 2015.11.10	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.09.30, BOPI nr. 9/2016
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: BATIR Ludmila, MD; SLANINA Valerina, MD; SIRBU Tamara, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de conservare a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* cu activitate antifungică**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de conservare a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* cu activitate antifungică.

Procedeul, conform invenției, prevede cultivarea tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 pe un mediu nutritiv în decurs de 48 ore la temperatura de 28...30°C, resuspendarea într-un mediu constituit din

2
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 1072 Z 2017.04.30

(54) Process for conservation of *Pseudomonas aureofaciens* strain with antifungal activity

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, particularly to a process for conservation of *Pseudomonas aureofaciens* strain with antifungal activity.

The process, according to the invention, provides for the cultivation of *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 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 *Pseudomonas aureofaciens* с антифунгальной активностью

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу консервирования штамма *Pseudomonas aureofaciens* с антифунгальной активностью.

Способ, согласно изобретению, предусматривает культивирование *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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 *Pseudomonas aureofaciens* cu activitate antifungică, și anume stimularea activității antifungice 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 păstrare și sporire a activității antifungice, procedeul dat poate fi utilizat la conservarea microorganismelor pe un termen îndelungat și utilizarea acestora ca agenți de prevenire și protejare a plantelor de cultură de infectarea cu fitopatogeni.

La un procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 care constă în stimularea activității antifungice 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 păstrare și sporire a activității antifungice, procedeul dat poate fi utilizat la conservarea microorganismelor pe un termen îndelungat și utilizarea acestora ca agenți de prevenire și protejare 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. Astfel, utilizarea microorganismelor în calitate de agenți cu proprietăți antimicrobiene pronunțate asupra fitopatogenilor ar permite atât majorarea productivității plantelor, cât și îmbunătățirea calității produsului.

În prezent este cunoscut un procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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 21,3...28,0 mm, în dependență de test-cultura studiată, însă dezavantajul acestuia constă în aceea că proprietățile antifungice sunt slabe și mai puțin pronunțate după păstrarea îndelungată [1].

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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 *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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 28,0 mm pentru *Fusarium oxysporum*, 27,7 – *Fusarium solani*, 26,3 – *Alternaria alternata*, 28,0 – *Botrytis cinerea* și 21,3 mm – *Aspergillus niger*.

Procedeul de conservare a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* cu activitate antifungică prevede cultivarea tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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.

Procedeul de conservare a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 permite stimularea evidentă a proprietăților antifungice asupra fitopatogenilor *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger* după 6 ani de păstrare.

După 6 ani de cultivare tulpina *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 atinge titrul de 10^4 ... $10^5 \log_{10}$ UFC ml⁻¹, astfel după fiecare pasaj care durează 24...48 ore putem crește titrul cu 2...3 unități, ceea ce ne permite de a obține o cantitate suficientă de cultură pentru a asigura securitatea acesteia.

Creșterea proprietăților antifungice, pot fi influențate de diferența conținutului mediului de protecție utilizat, astfel în componența laptelui care este un produs proteic intră un șir de macro- și microelemente, fermenți și vitamine care ulterior joacă un rol foarte important în sporirea sintezei fermenților și metaboliților secundari cu activitate antifungică.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că, pentru prima dată în calitate de mediu protector pentru liofilizarea tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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 *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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; $NaNO_3$ – 3,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4$ – 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 *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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 *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 asupra fitopatogenilor prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de microorganisme cu capacitate antifungică pronunțată, cu utilizarea acestora ca agenți de protejare a plantelor de cultură.

Rezultatele studiului activității antifungice după 6 ani de conservare, în urma liofilizării tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07, utilizând ca mediu protector laptele degresat + 12% zaharoză, sunt prezentate în tabel, care relevă o activitate mai sporită față de soluția cea mai apropiată. 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 2,1 ori caracteristicile analoage ale procedurii descris în cea mai apropiată soluție.

Tabel

Activitatea antifungică a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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	13,3±0,7	15,0±1,1	24,7±0,7	23,0±0,7	19,0±1,1
Conform soluției propuse în invenție	Liofilizarea pe mediul lapte degresat + 12% zaharoză	28,0±2,3	27,7±1,3	26,3±1,3	28,0±1,1	21,3±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 2,1 ori pe cele descrise în cea mai apropiată soluție.

- 5 Proprietățile depistate ale tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07, liofilizată conform procedurii revendicate, 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 *Pseudomonas aureofaciens* cu activitate antifungică, care prevede cultivarea tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-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 Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

DUBĂSARU Nina

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2015 0151 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2015.11.10 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) **Titlul: Procedeu de stimulare a activității antifungale a tulpinii *Pseudomonas aureofaciens* CNMN-PsB-07 asupra fitopatogenilor**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/38 (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

C12R1/38

Pseudomonas aureofaciens

fitopatogen

crioconsercare

păstrare

"Worldwide" (Espacenet):

EA, CIS (Eapatis):

C12N 1/04

C12N1/20

C12R1/38

Pseudomonas aureofaciens

криоконсервирование

хранение

SU (nonpublic):

Alte BD –

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/Standardizarea%20procedurii%20de%20conservare%20a%20tulpinilor%20de%20bacterii%20pastrate%20in%20colectia%20nationala%20de%20microorganisme%20nepatogene.pdf

<https://ru.wikipedia.org/wiki/%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%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D0%BD%D1%82>

<http://cyberleninka.ru/article/n/metody-dlitelnogo-hraneniya-kollektsionnyh-kultur-mikroorganizmov-i-tendentsii-razvitiya>

<http://bio-cat.ru/ebook.php?file=gerhardt1.djvu&page=96>

<http://chem21.info/info/1344972/>

http://bib.social/mikrobiologiya_1050/metodyi-dlitelnogo-hraneniya-74305.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	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	Slanina V., Lupașcu L., Tolocichina S., Burțeva S., Postolachi O., Sîrbu T., Stepanov V., Chiselița O. Standardizarea procedurii de conservare a tulpinilor de bacterii păstrate în colecția națională de microorganisme nepatogene. I. Standardizarea procedurii de conservare a tulpinilor din genul Pseudomonas păstrate în colecția națională de microorganisme. Buletinul AȘM. Științele vieții. Nr. 2(317) 2012, p160-167, găsit Internet <URL: < http://bsl.asm.md/article/id/223338 >	1
A	BY 17672 C1 2013.10.30	1
A	RU 2123044 C1 1998.12.10	1
A	SU 1093698 A 1984.05.23	1
A	SU 1698285 A1 1991.12.15	1
A	SU 1671682 A1 1991.08.23	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 2016.02.26

Examinator DUBĂSARU Nina