



MD 1056 Z 2017.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1056** (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 0149 (22) Data depozit: 2015.11.10	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.07.31, BOPI nr. 7/2016
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: BATÎR Ludmila, MD; SLANINA Valerina, MD; SÎRBU Tamara, MD; CHIȘELIȚA Oleg, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

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

(57) **Rezumat:**

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

Procedeul, conform invenției, prevede cultivarea tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 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 1056 Z 2017.02.28

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

(57) Abstract:

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

The process, according to the invention, provides for the cultivation of *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 strain on a nutrient medium for 48 hours at a temperature of

2
28...30°C, resuspension in a medium consisting of skim milk and 12% of sucrose with a titer of 10^{-8} ... 10^{-9} , rapid freezing at -20°C, lyophilization and storage at +4°C.

The result is to increase the antifungal activity of the strain after storage.

Claims: 1

(54) Способ консервирования штамма *Pseudomonas aurantiaca* с антифунгальной активностью

(57) Реферат:

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

Способ, согласно изобретению, предусматривает культивирование *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 на питательной среде в течение 48 часов при температуре 28...30°C, ресуспендирование в среде, состоящей из обезжиренного

2
молока и 12% сахарозы с титром 10^{-8} ... 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 aurantiaca* cu activitate antifungică.

5 Invenția poate fi utilizată în fitopatologie, și anume pentru stimularea activității antifungice a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 asupra fungilor 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, la conservarea
10 microorganismelor pe un termen îndelungat, utilizarea acestora ca agenți de protecție a plantelor de cultură previne infectarea cu fitopatogeni.

Afectarea plantelor de cultură de către fitopatogeni duce la scăderea productivității lor, micșorarea recoltei și diminuarea calității produsului obținut. Astfel, utilizarea microorganismelor în calitate de agenți cu proprietăți antimicrobiene pronunțate asupra
15 fitopatogenilor ar permite atât majorarea productivității plantelor, cât și îmbunătățirea calității produsului, metoda dovedindu-se a fi eficientă și ecologică.

În prezent este cunoscut un procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 asupra fungilor fitopatogeni în rezultatul liofilizării utilizând ca mediu protector succinat de Na + 12% zaharoză. În urma
20 realizării procedurii, după 6 ani de păstrare, zonele de inhibiție a patogenilor au atins valori de 21,3...23,0 mm, în dependență de test-cultura studiată. Dezavantajul procedurii constă în aceea că proprietățile antifungice ale tulpinii sunt relativ slabe după păstrarea îndelungată [1].

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în stimularea activității
25 antifungice a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08, în urma liofilizării, cu utilizarea unui mediu protector ce asigură stimularea proprietăților antifungice asupra fitopatogenilor, după 6 ani de păstrare.

Procedeu de conservare a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* cu activitate antifungică prevede cultivarea tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 pe un mediu
30 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.

Rezultatul se datorează liofilizării tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08, utilizând mediul de protecție lapte degresat + 12% zaharoză. Zonele de inhibiție a
35 creșterii fitopatogenilor, după 6 ani de la conservare, ating valori de 25,7 mm pentru *Fusarium oxysporum*, 26,0 – *Fusarium solani*, 25,3 – *Alternaria alternata*, 27,0 – *Botrytis cinerea* și 20,0 mm – *Aspergillus niger*.

Rezultatul constă în stimularea activității antifungice a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 care permite amplificarea evidentă a proprietăților
40 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 cea mai apropiată soluție. Zonele de inhibiție a creșterii fitopatogenilor obținute în rezultatul liofilizării cu utilizarea mediului protector succinat de Na + 12% zaharoză, cea mai apropiată soluție, variază de la 21,3...23,0 mm pentru tulpinile *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. alternata* și *B. cinerea* și lipsește pentru tulpina *A. niger*, iar zonele de inhibiție determinate cu utilizarea procedurii propus în invenție variază între
45 25,3...27,0 mm pentru tulpinile *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. alternata* și *B. cinerea* și 20,0 mm pentru tulpina *A. niger*, ceea ce depășește de până la 1,2 ori caracteristicile
50 analoage obținute conform prototipului.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de mediu protector pentru liofilizarea tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 se utilizează laptele degresat + 12% zaharoză. Proprietățile antifungice evidente
55 sunt asigurate prin resuspendarea 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 însămânțează tulpina *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08, după 48 ore de incubare la temperatura de 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.

Activitatea antifungică a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 după 6 ani de la liofilizare pe mediul protector lapte degresat + 12% zaharoză a fost determinată 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, depistate în urma elaborării procedurii de conservare și stimulare a activității antifungice a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 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 *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 utilizând 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 1,2 ori caracteristicile analoage ale procedurii descris în cea mai apropiată soluție.

Tabel

Activitatea antifungică a tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08, după 6 ani de conservare în stare liofilizată conform invenției și celei mai apropiate soluții

	Procedeul utilizat	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	21,3±0,7	22,0±1,1	21,3±0,7	23,0±1,1	–
Conform procedurii propus	Liofilizarea pe mediul lapte degresat + 12% zaharoză	25,7±2,4	26,0±1,1	25,3±0,7	27,0±1,1	20,0±1,1

5 Datele din tabel demonstrează că zonele de inhibiție determinate conform procedurii propus sunt mai mari și le depășesc de până la 1,2 ori pe cele descrise conform celei mai apropiate soluții, iar pentru tulpina *Aspergillus niger* zona de inhibiție lipsește în cazul utilizării celei mai apropiate soluții și atinge valoarea de 20,0 mm la utilizarea procedurii propus în invenție.

10 Proprietățile depistate ale tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 liofilizate, 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 *Pseudomonas aurantiaca* cu activitate antifungică, care prevede cultivarea tulpinii *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 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 0149 (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 *Pseudomonas aurantiaca* CNMN-PsB-08 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
 C12R 1/38
 Pseudomonas aurantiaca
 fitopatogen
 crioconservare
 păstrare

"Worldwide" (Espacenet):

EA, CIS (Eapatis):

C12N 1/04
 C12N1/20
 C12R 1/38
 Pseudomonas aurantiaca
 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%20microrganisme%20nepatogene.pdf

<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	MD 865 Y 2015.01.31	1
A	BY 17672 C1 2013.10.30	1
A	SU 1698285 A1 1991.12.15	1
A	RU 2123044 C1 1998.12.10	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 2016.02.25

Examinator DUBĂSARU Nina