



MD 4251 C1 2014.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4251** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2012 0087 (22) Data depozit: 2012.10.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.09.30, BOPI nr. 9/2013
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE PROTECȚIE A PLANTELOR ȘI AGRICULTURĂ ECOLOGICĂ AL AȘM, MD (72) Inventatori: ȘCERBACOVA Tatiana, 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 de fungi *Trichoderma lignorum*
CNMN-FD-14

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la microbiologie și fitopatologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 – producătoare de biopreparat care poate fi utilizat pentru protecția biologică și în calitate de stimulator de creștere a plantelor.

2
Mediul nutritiv, conform invenției, conține, în g/l: melasă din sfeclă de zahăr – 20,0; zaharoză – 10,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,0; CaCO_3 – 2,0 și apă potabilă – restul, cu pH 5,5...6,0.

Revendicări: 1

MD 4251 C1 2014.04.30

(54) Nutrient medium for cultivation of *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 fungal strain

(57) Abstract:

1

The invention relates to microbiology and phytopathology, in particular to a nutrient medium for cultivation of *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 fungal strain – producer of biopreparation that may be used for biological protection and as plant growth promoter.

2

The nutrient medium, according to the invention, comprises, in g/l: molasses from sugar beet – 20.0; sucrose – 10.0; KH_2PO_4 – 2.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; NaNO_3 – 2.0; CaCO_3 – 2.0 and drinking water – the rest, with pH 5.5...6.0.

Claims: 1

(54) Питательная среда для культивирования штамма грибов *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к микробиологии и фитопатологии, в частности к питательной среде для культивирования штамма грибов *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 – продуцирующего биопрепарат который может быть использован для биологической защиты и в качестве стимулятора роста растений.

2

Питательная среда, согласно изобретению, содержит, в г/л: мелассу из сахарной свеклы – 20,0; сахарозу – 10,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,0; CaCO_3 – 2,0 и питьевую воду – остальное, с pH 5,5...6,0.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și fitopatologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 – producătoare de biopreparat care poate fi utilizat pentru protecția biologică și în calitate de stimulator de creștere a plantelor.

Este cunoscut mediul nutritiv de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* F-5 – producătoare de Trihodermin, utilizată pentru combaterea agenților patogeni din genul *Fusarium*. Componenta mediului (g/l): peptonă – 3; zaharoză – 5; extract de porumb – 10; NaNO_3 – 2, apă curentă până la 1 litru, durata de cultivare constituie 6 zile [1].

Dezavantajele acestui mediu sunt prețul înalt al peptonei, durata îndelungată de cultivare, cât și faptul că preparatul obținut conține miceliu granular, care este greu de utilizat.

Se cunoaște, de asemenea, mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de fungi *Trichoderma sp.* MГ - 97 – producătoare de Trihodermin, cu compoziția (g/l): zaharoză – 25,4; extract de porumb – 31,8; KH_2PO_4 – 3,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,645, agar-agar – 20, apă până la 1 litru. Cultivarea se efectuează pe mediu solid timp de 15 zile, la temperatura de 28°C, până la obținerea unei pelicule miceliale, care apoi se usucă și se mărunțește sub formă de praf [2].

Dezavantajele acestui mediu sunt perioada îndelungată de cultivare, numărul impunător de etape și lucrul anevoios de obținere a preparatului.

În calitate de cea mai apropiată soluție se consideră mediul Waksman, care se optimizează în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, cu următoarea componență (g/l): peptonă – 5,0; glucoză – 10,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; apă potabilă până la 1 litru; pH – 5,5...6,0 [3].

În urma cultivării submerse a tulpinii *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 pe mediul menționat, timp de 6 zile la temperatura de 28...30°C, în condiții de agitare continuă, se obține un biopreparat care manifestă activitate antifungică față de speciile *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiella* și *Botrytis cinerea*, diametrul zonei de inhibiție constituind 26,7...33,3 mm, această proprietate conducând la stimularea creșterii plantulelor de floarea-soarelui cu 38%.

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că pe mediul Waksman tulpina nu-și realizează potențialul antifungic maxim.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare submersă a tulpinii *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14, care să asigure obținerea unui biopreparat cu proprietăți antifungice și de stimulare a creșterii plantelor, de asemenea să ducă la reducerea duratei de cultivare.

Esența invenției constă în faptul că se propune un mediu nutritiv optimizat pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14, componentele fiind luate în următorul raport (g/l): melasă din sfeclă de zahăr – 20,0; zaharoză – 10,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,0; CaCO_3 – 2,0; apă potabilă până la 1 litru; pH 5,5 ... 6,0.

Rezultatul tehnic al invenției constă în reducerea duratei de cultivare a tulpinii de fungi cu 2 zile și în obținerea unui biopreparat cu proprietăți antifungice și stimulatorii mai pronunțate față de cea mai apropiată soluție.

Datele prezentate sunt media a 10 probe.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Tulpina *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14 se cultivă în baloane Erlenmayer de 0,75 l în care se introduc câte 200 ml de mediu din cadrul celei mai apropiate soluții, cu compoziția (g/l): peptonă – 5,0; glucoză – 10,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; apă potabilă până la 1 litru; pH- 5,5...6,0 și paralel 200 ml de mediu optimizat ce conține (g/l): melasă din sfeclă de zahăr – 20,0; zaharoză – 10,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,0; CaCO_3 – 2,0; apă potabilă până la 1 litru; pH-ul 5,5 ... 6,0, în condiții de agitare continuă (200 rpm), la temperatura de 28...30°C, timp de 7 zile.

Activitatea antifungică a biopreparatelor obținute se determină în dinamică începând cu ziua a 4-a, conform metodei de difuzie. Fitopatogenii *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiella* și *Botrytis cinerea* se însămânțează în cutii Petri cu mediu malț-agar, apoi în fiecare cutie se face câte un godeu în care se introduce câte 1ml biopreparat. Difuzia biopreparatului durează 24 ore, la temperatura de 4°C, apoi se inoculează fitopatogenii, care se cultivă timp de 3...4 zile, la temperatura de 28...30°C. Activitatea antifungică se determină conform diametrului zonei de inhibiție a fitopatogenilor.

Maximumul activității antifungice față de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiella* și *Botrytis cinerea* a biopreparatului obținut pe mediul proxim a fost înregistrat după 6 zile de cultivare (diametrul zonelor de inhibiție – 33,3; 26,0 și 26,7 mm, respectiv), iar pe mediul propus după 4 zile de cultivare (diametrul zonelor de inhibiție – 60,7; 40,0 și 35,7 mm, respectiv).

Tabelul 1

Activitatea antifungică a biopreparatului în dependență de durata și mediul de cultivare a tulpinii *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14

Culturile-Test	Durata de cultivare, zile.			
	Diametrul zonei de inhibiție, mm			
	Mediul proxim			Mediul optimizat
	4	5	6	4
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18,70±2,36	26,30±1,31	33,30±2,36	60,70±2,36
<i>Fusarium sporotrichiella</i>	14,00±1,13	20,30±0,65	26,00±1,13	40,00±1,31
<i>Botrytis cinerea</i>	13,30±1,31	19,70±1,73	26,70±0,65	35,70±1,73

Exemplul 2

Pentru verificarea prin comparație a efectului stimulator al biopreparatului obținut pe mediul proxim, cât și pe cel optimizat au fost montate experimente vegetative de laborator. În calitate de material semincer s-au folosit boabe de floarea-soarelui (soiul Rodnicic).

Experimentele s-au efectuat în condiții de cameră, la temperatura de 20... 24°C, în sol steril, cu umiditatea de 60...80% și iluminarea de zi. Durata experimentului a constituit 10 zile.

Semințele de floarea-soarelui au fost prelucrate cu biopreparatul obținut pe mediul proxim după 6 zile de cultivare, iar cu preparatul obținut pe mediul optimizat după 4 zile de cultivare.

Rezultatele obținute în experimentele de laborator au arătat că biopreparatul obținut pe mediul optimizat în comparație cu biopreparatul proxim este mai efektiv.

Tabelul 2

Activitatea stimuloare a biopreparatului pentru floarea-soarelui în dependență de mediul de cultivare a tulpinii *Trihoderma lignorum* CNMN-FD-14

Indicii de biomasă, M±m	Tratarea semințelor cu biopreparat proxim	Tratarea semințelor cu biopreparat optimizat
Lungimea plantulei, cm	7,10±0,30	9,80±0,28
Masa a 100 de plantule, g	74,20±4,50	86,80±3,20
Masa rădăcinilor la 100 plantule, g	9,10±0,40	11,60±0,45

Masa a 100 de plantule și masa rădăcinilor la 100 plantule de floarea-soarelui sub influența biopreparatului obținut pe mediul optimizat a sporit cu 17% și 27,5% respectiv, iar lungimea plantulelor – cu 38% față de proxim.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2121793 C1 1998.11.20
2. RU 2171580 C1 2001.08.10
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Егорова М.С. Москва, МГУ, 1995, 224 p.

(57) Revendicări:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN-FD-14, care conține melasă din sfeclă de zahăr, zaharoză, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , CaCO_3 și apă potabilă, cu pH 5,5...6,0, componentele fiind luate în următorul raport, g/l:

melasă din sfeclă de zahăr	20,0
zaharoză	10,0
KH_2PO_4	2,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
NaNO_3	2,0
CaCO_3	2,0
apă potabilă	restul.

Șef secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2012 0087

(22) Data depozit: 2012.10.12

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE PROTECȚIE A PLANTELOR ȘI AGRICULTURĂ ECOLOGICĂ AL AȘM, MD**

(54) **Titlul: Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* CNMN FD 14**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12N 1/14* (2006.01)

C12R 1/885 (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): «NaNO₃ cultivare fungică», «carbonat de calciu cultivare fungică», «melasă de sfeclă cultivare fungică», «zaharoză cultivare fungică», «trichoderma mediu de cultivare»

Int. Cl : *C12N 1/14; C12R 1/885*

"Worldwide" (Espacenet): «NaNO₃ fungal cultivation», «calcium carbonate fungal cultivation», «beet molasses fungal cultivation», «saccharose fungal cultivation», «trichoderma cultivation media», «trichoderma lignorum»

Int. Cl : *C12N 1/14; C12R 1/885*

EA, CIS (Eapatis): «NaNO₃ культивирование грибов», «карбонат кальция культивирование грибов», «меласса культивирование грибов», «сахароза культивирование грибов», «триходерма питательная среда»

Int. Cl : *C12N 1/14; C12R 1/885*

SU (nonpublic): «NaNO₃ культивирование грибов», «карбонат кальция культивирование грибов», «меласса культивирование грибов», «сахароза культивирование грибов», «триходерма питательная среда»

Int. Cl : *C12N 1/14; C12R 1/885*

RO-Patent: «NaNO₃ cultivare fungică», «carbonat de calciu cultivare fungică», «melasă de sfeclă cultivare fungică», «zaharoză cultivare fungică», «trichoderma mediu de cultivare»

Int. Cl : *C12N 1/14; C12R 1/885*

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://book.tr200.net/v.php?id=1766789>

<http://prh.hec.gov.pk/Chapters/885S-3.pdf>

http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol2/cd-a3/data/jchem&cs/english/n7/full/57-60.pdf

<http://agr-souz.ru/bio-preparaty/trihofit.html>

<http://biotehnologii.md/index.php/2011/05/chto-takoe-trichoderma/>
http://magz.elibraries.eu/ul/726/Pochvovedenie_2007_05.pdf
<http://eco-club.dn.ua/magazin/trioxofit-trioxodermin-05-l/>

Мицько Е.С., Крейер В.Г., Егоров Н.С., Лойко Н.Г., Голод Н.А. Микробиология. 2008, Т. 77, № 3, с. 318–323

Reeta Rani Singhanian, Rajeev K. Sukuraman, Anu Pillai, P. Prema et.al. Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. Indian Journal of Biotechnology, 2006, vol. 5, p. 332-336

Asma Murtaza, Shazia Shafique, Tehmina Anjum and Sobiya Shafique. In vitro control of *Alternaria citri* using antifungal potentials of *Trichoderma* species. African Journal of Biotechnology, 2012, Vol. 11(42), p. 9985-9992

Lobanok AG, Pavlovskaja Zhi. Derepression of cellulase synthesis in *Trichoderma lignorum* during limitation of consumption of readily available carbon sources. , 1977, 46(3), p. 428-432

L. Olsson, T.M. Christensen, K.P. Hansen, E.A. Palmqvist. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* RUT C-30. Enzyme Microbiol. Technol., 2003, 33(5), p. 612–619

Andre Schuster and Monika Schmoll. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010, 87(3), p. 787–799

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	CN 102499265 A 2012.06.20	1
A	RO 126765 A2 2011.10.28	1
A	JP 59120087 A 1984.07.11	1
A	SU 1717052 A1 1992.03.07	1
A	RU 2077204 C1 1997.04.20	1
A	RU 2005129544 A 2007.03.27	1
A	MD 2340 G2 2003.12.31	1
A	RU 2096449 C1 1997.11.20	1
A	MD 2836 G2 2005.08.31	1
A	MD 3943 G2 2009.07.31	1
A	MD 1748 G2 2001.09.30	1
A	MD 1987 G2 2002.08.31	1
A	MD 2385 G2 2004.02.29	1
A	MD 2590 G2 2004.10.31	1
A	WO 2007071204 A1 2007.06.28	1
A	RU 2370017 C1 2009.10.20	1
A	RU 2322795 C1 2008.04.27	1
A	RU 2245917 C2 2005.02.10	1
A	RU 21407311 C1 1999.11.10	1
A	RU 2128422 C1 1999.04.10	1
A	RU 2213138 C2 2003.09.27	1
A	RU 2165974 C2 2001.04.27	1
A	RU 2195490 C2 2002.12.27	1
A, D	RU 2121793 C1 1998.11.20	1

A, D	RU 2171580 C1 2001.08.10	1
A, D, C	Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Егорова М.С. Москва, МГУ, 1995, 224 с	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		2013.06.26
Examinator		LUPAȘCU Lucian