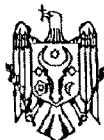




MD 4249 B1 2013.08.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4249** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2012 0086 (22) Data depozit: 2012.10.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.08.31, BOPI nr. 8/2013
(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 PROTECȚIE A PLANTELOR ȘI AGRICULTURĂ ECOLOGICĂ AL AȘM, MD	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma virens* CNMN-FD-13

(57) Rezumat:

Invenția se referă la microbiologie și fitopatologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma virens* CNMN-FD-13 – producătoare de bio-preparat care poate fi utilizat pentru protecția biologică a plantelor.

Mediul nutritiv, conform invenției, conține, în g/L: sirop de glucoză – 20,0; zaharoză – 10,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 1,0; extract de drojdii – 10,0; CaCO_3 – 2,0 și apă – restul, având pH-ul 5,5...6,0.

Revendicări: 1

MD 4249 B1 2013.08.31

(54) Nutrient medium for cultivation of fungal strain *Trichoderma virens* CNMN-FD-13

(57) Abstract:

1
The invention relates to microbiology and
phytopathology, in particular to a nutrient
medium for cultivation of fungal strain
Trichoderma virens CNMN-FD-13 – producer
of biopreparation that may be used for
biological protection of plants.

2
The nutrient medium, according to the
invention, comprises, in g/L: glucose syrup –
20.0; sucrose – 10.0; KH_2PO_4 – 1.0;
10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; NaNO_3 – 1.0; yeast
extract – 10.0; CaCO_3 – 2.0 and water – the
rest, having the pH 5.5...6.0.

15 Claims: 1

(54) Питательная среда для культивирования штамма грибов *Trichoderma virens* CNMN-FD-13

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к микробиоло-
гии и фитопатологии, в частности к
питательной среде для культивирования
штамма грибов *Trichoderma virens* CNMN-
FD-13 – продуцирующий биопрепарат
который может быть использован для
биологической защиты растений.

2
Питательная среда, согласно изобре-
тению, содержит, в г/л: глюкозный сироп –
20,0; сахарозу – 10,0; KH_2PO_4 – 1,0;
10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 1,0;
дрожжевой экстракт – 10,0; CaCO_3 – 2,0 и
воду – остальное, имея pH 5,5...6,0.

15 П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la microbiologie și fitopatologie, în particular la un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma virens* CNMN-FD-13 – producătoare de biopreparat care poate fi utilizat pentru protecția biologică a plantelor.

5 Este cunoscut mediul nutritiv de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Trichoderma lignorum* F-5 – producătoare de Trichodermin, utilizat la combaterea agenților patogeni ai plantelor de cultură. Componenta mediului nutritiv (g/l): peptonă – 3; zaharoză – 5; extract de porumb – 10; NaNO₃ – 2; apă până la 1 litru. Durata de cultivare constituie 6 zile [1].

10 Dezavantajul acestui mediu constă în prețul înalt al peptonei, durata lungă de cultivare a tulpinii, precum și faptul că preparatul conține miceliu granular, care e greu de utilizat.

Se mai cunoaște mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma sp.* MF-97– producătoare de Trihodermin, cu următoarea compoziție (g/l): zaharoză – 25,4; extract de porumb – 31,8; KH₂PO₄ – 3,14; MgSO₄x7H₂O – 0,6; 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].

20 Dezavantajul acestui mediu constă în perioada îndelungată de cultivare a tulpinii, numărul impunător de etape și lucru anevoios de obținere a preparatului.

În calitate de cea mai apropiată soluție pentru cultivarea submersă a tulpinii *Trichoderma virens* CNMN-FD-13 s-a utilizat mediul Waksman cu următoarea compoziție (g/l): peptonă – 5,0; glucoză – 10,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄x7H₂O – 0,5; apă potabilă până la 1 litru [3].

25 Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că pe el nu se realizează pe deplin potențialul biosintetic al tulpinii și activitatea antifungică nu atinge valoarea maximă. Maximumul activității antifungice a biopreparatului obținut la cultivarea tulpinii pe mediul menționat s-a înregistrat în a 6-a zi de cultivare, la temperatura de 27...29°C, în condiții de agitare continuă. Diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenilor *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiela*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Monilia cinerea* tratați cu biopreparat constituie 25...30 mm.

30 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Trihoderma virens* CNMN-FD-13, care să asigure obținerea unui biopreparat cu proprietăți antifungice sporite și reducerea duratei de cultivare.

35 Esența invenției constă în faptul că se propune un mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma virens* CNMN-FD-13, componentele fiind luate în următorul raport, g/L: sirop de glucoză – 20,0; zaharoză – 10,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄x7H₂O – 1,0; NaNO₃ – 1,0; extract de drojzii – 10,0; CaCO₃ – 2,0 și apă – restul, având pH-ul 5,5...6,0.

40 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea activității antifungice a biopreparatului față de agenții patogeni *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiela*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Monilia cinerea* de 1,5...2,0 ori față de cea mai apropiată soluție și în reducerea duratei de cultivare cu 1 zi.

45 *Exemplu de realizare a invenției*

Tulpina *Trihoderma virens* CNMN-FD-13 s-a cultivat în baloane Erlenmayer de 0,75 l, în care s-au introdus câte 200 ml de mediu proxim și optimizat, în condiții de agitare continuă (200 r.p.m) la temperatura de 27...29°C timp de 5 zile. Culturile fitopatogene au fost însămânțate în cutii Petri pe mediu de malț-agar. În centrul cutiei s-a făcut un godeu de 0,6 mm în care s-a introdus 1 ml de biopreparat. Difuzia biopreparatului a avut loc la temperatura de 4°C timp de 24 ore, după care cutiile s-au plasat în termostat pentru incubare timp de 3...4 zile la temperatura de 29°C, apoi s-a măsurat zona de inhibiție a fitopatogenilor. Activitatea antifungică a 1 ml de biopreparat obținut prin cultivarea tulpinii în mediul proxim, cât și în mediul optimizat a fost determinată în dinamică, începând cu ziua a 4-a de cultivare, în conformitate cu diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenilor: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium sporotrichiela*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Monilia cinerea*. Datele prezentate reprezintă media a 10 probe.

Tabel

Activitatea antifungică a biopreparatului în dependență de durata de cultivare a tulpinii *Trichoderma virens* CNMN-FD-13

Culturile testate	Durata de cultivare, zile				
	Diametrul zonei de inhibiție, mm				
	Mediul proxim			Mediul optimizat	
	4	5	6	4	5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	20,3 ± 2,36	28,3 ± 1,73	30,7 ± 1,31	35,3 ± 2,85	62,3 ± 2,85
<i>Fusarium sporotrichiela</i>	14,3 ± 1,73	20,3 ± 0,65	24,7 ± 1,85	22,3 ± 2,85	35,3 ± 2,85
<i>Botrytis cinerea</i>	14,7 ± 3,46	20,0 ± 1,13	23,7 ± 1,73	23,7 ± 0,65	36,0 ± 1,96
<i>Monilia fructigena</i>	16,3 ± 1,73	18,3 ± 1,73	24,3 ± 1,31	25,3 ± 0,65	36,3 ± 1,73
<i>Monilia cinerea</i>	15,0 ± 1,13	20,3 ± 0,65	25,0 ± 1,13	20,7 ± 2,36	38,0 ± 1,13

5

Valoarea maximă a diametrului zonei de inhibiție a fitopatogenilor testați sub acțiunea biopreparatului obținut în mediul proxim de 23,7...30,7 mm a fost înregistrat în a 6-a zi de cultivare a tulpinii *Trichoderma virens* CNMN-FD-13.

10

Valoarea maximă a diametrului zonei de inhibiție a fitopatogenilor testați sub acțiunea biopreparatului obținut în mediul optimizat a fost înregistrată în a 5-a zi de cultivare a tulpinii și este de 1,5...2,0 ori mai mare față de biopreparatul obținut din mediul proxim. Astfel, zona de inhibiție a agentului fitopatogen *Sclerotinia sclerotiorum* sub acțiunea biopreparatului obținut în mediul optimizat constituie 62,3 ± 2,85 mm față de 30,7 ± 1,31 mm în mediul proxim, iar zona de inhibiție a agenților fitopatogeni: *Fusarium sporotrichiela*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena* și *Monilia cinerea* este de 35,3...38,0 mm.

20

(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 с

(57) Revendicări:

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Trichoderma virens* CNMN-FD-13, care conține sirop de glucoză, zaharoză, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , extract de drojdii, CaCO_3 și apă, având pH-ul 5,5...6,0, componentele fiind luate în următorul raport, g/L:

sirop de glucoză	20,0
zaharoză	10,0
KH_2PO_4	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
NaNO_3	1,0
extract de drojdii	10,0
CaCO_3	2,0
apă	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 0086

(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 virens* CNMN-FD-13**

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», «extract de drojdii cultivare fungică», «zaharoză cultivare fungică», «trihoderma cultivare fungică»
Int. Cl : **C12N 1/14; C12R 1/885**

"Worldwide" (Espacenet): «NaNO₃ fungal cultivation», «calcium carbonate fungal cultivation», «yeast extract fungal cultivation», «saccharose fungal cultivation», «trichoderma cultivation media»
Int. Cl : **C12N 1/14; C12R 1/885**

EA, CIS (Eapatis): «NaNO₃ культивирование грибов», «карбонат кальция культивирование грибов», «дрожжевой экстракт культивирование грибов», «сахароза культивирование грибов», «триходерма культивирование грибов»
Int. Cl : **C12N 1/14; C12R 1/885**

SU (nonpublic): «NaNO₃ культивирование грибов», «карбонат кальция культивирование грибов», «дрожжевой экстракт культивирование грибов», «сахароза культивирование грибов», «триходерма культивирование грибов»
Int. Cl : **C12N 1/14; C12R 1/885**

RO-Patent: «NaNO₃ cultivare fungică», «carbonat de calciu cultivare fungică», «extract de drojdii cultivare fungică», «zaharoză cultivare fungică», «trihoderma cultivare fungică»
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://pr.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/hto-takoe-trichoderma/>
http://magz.elibraries.eu/ul/726/Pochvovedenie_2007_05.pdf
<http://eco-club.dn.ua/magazin/trixofit-trixodermin-05-1/>

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 Singhania, 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

S. Harikrishna, K.C.S. Rao, J.S. Babu, D.S. Reddy. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM9414, Bioprocess Eng., 2000, 22, p. 467–470

M. Mandels, E.T. Reese. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, J. Bacteriol., 1957, 73, p. 269–278

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

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria* pertinente vizate	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor Numărul revendicării	
A	MD 2340 G2 2003.12.31	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 2096449 C1 1997.11.20	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	2013.05.29	
Examinator	LUPAȘCU Lucian	