



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00564**

(22) Data de depozit: **20/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2023 BOPI nr. **3/2023**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU LEGUMICULTURĂ
ȘI FLORICULTURĂ VIDRA-ICDLF VIDRA,
CALEA BUCUREȘTI, NR.22, VIDRA, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **ZĂGREAN ALEXANDRU VALENTIN,
ȘOS.PANDURILOR, NR.60, BL.A, SC.2,
ET.3, AP.67, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **SBÎRCIOG GICUȚA, STR.PRINCIPALĂ,
NR.73, COMUNA VIDRA, IF, RO;**

• **ȘOVĂREL GABRIELA,
STR. DR. ION GHIULAMILA, NR.26, ET.3,
AP.3, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NICOLCIOIU MIHAI BOGDAN, STR.SIRET,
NR.29, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RUSU IONUȚ-CRISTIAN,
CARTIER BROȘTENI, BL.C6, ET.3, AP.13,
BUZĂU, BZ, RO**

(74) Mandatar:
**CABINET N.D. GAVRIL S.R.L.,
STR.ȘTEFAN NEGULESCU NR.6A,
SECTOR 1, BUCUREȘTI**

(54) **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE OPTIMIZARE A RATEI
DE CREȘTERE A MICELIILOR DIN TULPINI DE *PLEUROTUS
ERYNGII* PENTRU SPORIREA CANTITĂȚII DE BIOMASĂ
MICELIANĂ OBTINUTĂ *IN VITRO***

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu biotehнологic de obținere biomasă miceliană *in vitro* din tulpini de *Pleurotus eryngii*. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: obținerea și propagarea culturilor-mamă pe medii agarizate cu extract de compost pentru cultivarea ciupercilor *Agaricus bisporus* având un pH de 6,5...6,7, un raport C/N de 13:1 și un conținut de azot total de 2,6...2,7% s.u., propagarea/ subcultivarea submersă a

miceliilor, în mediu lichid, pentru utilizare ca inocul/ miceliu lichid sau pentru obținerea de biomasă miceliană/fungică, rezultând o rată de creștere optimizată a miceliilor și o cantitate sporită de biomasă miceliană *in vitro*.

Revendicări: 3
Figuri: 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 0564
Data depozit 20-09-2021

Procedeu biotehnologic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*.

Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*.

Prin acest procedeu, utilizându-se formule îmbunătățite de medii nutritive suplimentate cu extract de compost specific culturii ciupercilor champignon (*Agaricus bisporus*), se asigură un start mai bun și o creștere mai rapidă a miceliilor de *Pleurotus eryngii* cultivate *in vitro*. În plus, utilizarea acestui procedeu are efect amplificator de etapă în fluxul biotehnologiei producerii de miceliu pentru ciupercării, obținându-se un spor semnificativ de producție.

Este cunoscut faptul ca ciupercile din grupul *Pleurotus* constituie agenți foarte eficienți de reciclare biologică a diferitelor deșeuri/subproduse lignocelulozice agroforestiere sau provenind din industria alimentară, textilă, a hârtiei, etc. În cadrul grupului, specia *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel se distinge prin bazidiocarpii/ciupercile cele mai mari, cele mai gustoase atunci când sunt gătite și cu cea mai mare perioadă de păstrare în stare proaspătă.

Încadrarea lor sistematică este următoarea: regnul *Fungi*, diviziunea/încrengătura *Basidiomycota*, clasa *Agaricomycetes*, ordinul *Agaricales*, familia *Pleurotaceae*, genul *Pleurotus* (Fr.) P.Kummer

Sunt cunoscute diferite metode de obținere a mediului de cultivare a miceliilor de *Pleurotus eryngii* ca de exemplu:

Brevetul RO 121718 - "Metodă de producere a miceliului comercial de ciuperci comestibile, pe substraturi constituite din deșeuri viti-vinicole" utilizează medii nutritive constituite preponderent din deșeuri vegetale, rezultate în cursul proceselor de prelucrare agroindustrială, care se aplică în agricultură și în vinificație, respectiv, a coardelor și a frunzelor de viță de vie, precum și a tescovinei din struguri.

Brevetul RO 129413 - "Tehnologie pentru produs miceliu de ciuperci cu ajutorul microundelor" se referă la obținerea miceliului de ciuperci în condiții sterile prin dezinfectarea/sterilizarea cerealelor sortate, prespălate și preinpregnate cu ajutorul câmpului de microunde, fără a realiza un grad ridicat de încălzire a suportului.

Brevetul MD 1522 – „Procedeu pentru cultivarea ciupercilor *Pleurotus*” - cuprinde tratamentul blocurilor de substrat inoculate cu un câmp magnetic alternativ pulsat cu o inducție de 40-50 μ T și o frecvență de 16,5 Hz, timp de 15 minute, cu plasarea ulterioară a acestora în ferma de ciuperci pentru creștere.

Brevetul RO 108697 – ”Suport de creștere, pentru miceliu intermediar inocul de *Pleurotus sp* și procedeu de realizare a acestuia” – prezintă etapele succesive reprezentate prin obținerea și utilizarea următoarelor biopreparate pe medii/suporturi nutritive solide: cultura-stock - cultura pură reprezentativă pentru o izolată/tulpină/specie, păstrată pe medii agarizate în colecție, la +1-3°C, frigider; cultura-mamă - cultură pură obținută direct din cultura-stock, printr-un singur transfer /pasaj pe mediu proaspăt agarizat; miceliu intermediar (inocul) - se obține prin inocularea cu miceliu dintr-o cultura-mamă a unui flacon cu suport granulat (boabe grâu)/suport lemnos (baghete din lemn) steril; miceliu comercial - materialul biologic pentru însămânțare în ciupercărie, obținut în flacoane din sticlă/polipropilenă sau pungi din polipropilenă cu suport granulat sterilizat, prin inoculare cu miceliu intermediar (Brev.Inv.RO 108697 B1-1994; Mateescu și Zăgrean, 2003; Zăgrean, A.V., 2008).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unor medii nutritive pentru cultura *in vitro* a miceliilor unor tulpini de ciuperci din specia *Pleurotus eryngii*, folosind un extract de compost specific cultivării ciupercilor *Agaricus bisporus*, care asigura și susțin creșterea mai rapidă, un start mai bun și un amplificator de etapă în producția de miceliu pentru ciupercării și/sau pentru obținerea unor cantități sporite de biomasă miceliană cu multiple utilizări în domenii diverse: nutriție, prevenirea și tratarea unor afecțiuni medicale, prevenirea îmbătrânirii premature.

Procedeu biotehnic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro* conform invenției se desfășoară în două etape.

- etapa/faza obținerii și propagării culturilor-mamă pe medii agarizate;
- etapa/faza tehnologică a propagării/subcultivării submerse a miceliilor, în mediu lichid, pentru utilizare ca inocul/miceliu lichid sau pentru obținerea de biomasă miceliană/fungică.

Procedeu biotehnic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*,

constă în aceea că se prepară un extract de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus* folosind 200 g compost gata preparat și măcinat cu particule ≤ 1 mm; care se lasă la macerat într-un vas cu 2.0 l apă distilată timp de 4 ore la temperatura de 25°C, amestecându-se de 2-3 ori; acesta se strecoară prin sită fină, iar lichidul rezultat se filtrează la vid; depozitul solid rămas se resuspendă în 0,5 l lichid din prima extracție și se fierbe 10 min; se filtrează din nou, iar lichidul rezultat se amestecă împreună cu primul, utilizat ca supliment organic complex atât în etapa obținerii și propagării culturilor-mamă pe medii agarizate cât și în etapa propagării/subcultivării submerse a miceliilor în mediu lichid, pentru utilizare ca inocul/miceliu lichid sau pentru obținerea de biomasă miceliană/fungică.

Procedeu biotehnologic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*, pentru obținerea de cultura-mamă pe mediu nutritiv cu extract de compost se procedează astfel:

- se prepară extractul de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus*;
- se prepară mediul de cultură solid (agarizat): extract de cartofi 2,4% + extract de malt 1,7% + extract de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus* 50 ml /L + agar 2%;
- mediul nutritiv se aduce la valoarea de pH 6,5 și se repartizează în flacoane de 500/1000 ml cu dop care se sterilizează în autoclav 20 min la 121°C;
- mediul sterilizat se scoate din autoclav și se repartizează în plăci Petri (\varnothing 90 mm), câte 15-18 ml mediu/placă în condiții sterile
- după 24 ore, plăcile Petri cu mediu solid agarizat sunt inoculate, la hota sterilă cu flux laminar: în mijlocul fiecărei plăci Petri se dispune câte un fragment rotund de inocul cu \varnothing 5 mm recoltat de la marginile coloniilor miceliene ale culturilor-stock din colecție;
- plăcile inoculate sunt incubate timp de 10-12 zile la 25-27°C (incubator/termostat), până când miceliile în creștere acoperă întreaga suprafață a mediilor de cultură; rata de creștere a miceliului este de 183 % pe varianta cu extract de compost față de varianta martor, după 7 zile de la inoculare la temperatura de 25 -27 °C.

Procedeu biotehnologic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*, pentru propagarea/subcultivarea submersă a miceliilor în mediu lichid se procedează astfel:

- se prepară extractul de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus*,
- se prepară mediul de cultură lichid: extract de cartof 2,4% + extract de drojdie 2 g/L + K_2HPO_4 1 g/L + extract de malț 2 g/L + fructoză 10 g/L + extract de compost 50 ml/L și se aduce indicele pH la valoarea de 6,5;
- mediul lichid preparat se repartizează în flacoane Erlenmeyer închise cu dop, se sterilizează în autoclav 20 min la 121°C; se scot din autoclav și se lasă să se răcească la o temperatură sub 28°C într-o incintă sterilă.
- flacoanele cu mediu lichid sunt inoculate la hota cu flux laminar cu miceliu provenit din culturile-mamă pregătite, respectiv cu câte 4-5 fragmente rotunde de miceliu recoltate cu \varnothing 5 - 10 mm din marginile coloniilor miceliene ale culturilor-mamă;
- flacoanele cu mediu lichid inoculat sunt incubate pe agitatorul orbital cu 100 rpm la întuneric timp de 14 zile, la 25-27°C;
- miceliile tulpinilor testate sunt separate de lichidul din flacoane prin filtrare;
- biomasa obținută se spală de mai multe ori cu apă distilată;
- biomasa este apoi deshidratată (uscată) la etuvă timp de cca. 36 ore la 40°C, până când masa cântărită rămâne constantă; sau este liofilizată ;
- rata de creștere a cantității de biomasă uscată este de 152,93% raportată la 1000 ml soluție nutritivă față de varianta martor.

Invenția, prin îmbunătățirea rețetei de mediu de propagare *in vitro*, prezintă următoarele avantaje:

- pe fluxul de producere a miceliului pentru însămânțare se reduce timpul de obținere al produsului final, cu economii energetice;
- se reduce perioada de incubare a miceliilor cultivate *in vitro*
- scade posibilitatea apariției și dezvoltării infecțiilor cu microorganisme (fungi, bacterii) concurente/potențial patogene;
- se îmbunătățește starea de nutriție a miceliilor, acestea capătă valențe suplimentare de vigoare și rezistență la factori biotici/abiotici adverși,
- se asigură o pregătire mai bună pentru procesul de colonizare a substratului de cultură după însămânțare și pentru fructificare;
- miceliu pentru însămânțare - "miceliu lichid", obținut prin cultivare submersă asigură o viteză sporită de creștere în substratul lignocelulozic și, ca urmare, colonizarea rapidă a acestuia și micșorarea riscului dezvoltării microorganismelor contaminante în perioada premergătoare fructificării;

- "miceliu lichid" asigură o puritate excepțională a materialului biologic de înșămânțare, reprezentat prin miceliile speciilor de ciuperci propagate

- ușurința deosebită cu care pot fi manipulate;

- în cazul obținerii de biomasă miceliană, mediul mai bogat în elemente nutriționale asigură, atât sporirea cantității de biomasă, cât și o calitate superioară a acesteia printr-un conținut sporit de compusi bioactivi cu utilizări în medicină, farmacie, industrie agro-alimentară.

- miceliul crescut în cultură submersă pe/în medii lichide pentru obținerea de biomasă fungică are diverse întrebuințări în produse nutraceutice, extracte utilizate în protocoale pentru întârzierea îmbătrânirii, prevenirea și tratarea unor afecțiuni;

Se dă în continuare un exemplu de realizare în legătură și cu fig. 1 - 10 care reprezintă :

Fig. 1 – Schema procedurii biotehnologice de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*.

Fig. 2 – Efectul extractului de compost asupra creșterii miceliilor de *P.eryngii* pe medii agarizate, incubate 7 zile la temperatura de 25-27 °C. Variantele de mediu nutritiv V₄ și V₅ conțin extract de compost (foto)

Fig. 3 – Creșterea miceliului la 3 tulpini de *Pleurotus eryngii* pe medii agarizate suplimentate cu surse de azot, carbon și minerale, incubate 7 zile la temperatura de 25-27 °C pe plăci Petri (Ø 90 mm). Variantele de mediu V₄ și V₅ conțin extract de compost (grafic)

Fig. 4 – Efectul extractului de compost asupra creșterii miceliilor de *P.eryngii* pe medii agarizate, incubate 10 zile la temperatura de 25-27 °C pe plăci Petri (Ø 90 mm) – Varianta de mediu nutritiv V₇ conține extract de compost (foto)

Fig. 5 - Creșterea miceliului la 3 tulpini de *Pleurotus eryngii* pe medii agarizate suplimentate cu surse de azot, carbon și minerale, incubate 7 zile la temperatura de 25-27 °C. Varianta de mediu V₇ conține extract de compost (grafic)

Fig. 6 – Cantitatea de biomasă uscată obținută în cultură submersă (g/L) la *Pleurotus eryngii* - tulpinile PeM-41 și PeM-45. Varianta de mediu nutritiv lichid V₇ conține extract de compost. 14 zile de incubare la 25-27 °C (grafic)

Fig. 7 – Efectul extractului de compost asupra creșterii miceliilor de *P.eryngii*, tulpina PeM-41, în culturi submerse (medii lichide) incubate 10 zile la temperatura de 25-27 °C - fara extract de compost vs cu extract de compost .

Fig. 8 - Efectul extractului de compost asupra creșterii miceliilor de *P. eryngii*, tulpina PeM-45, în culturi submerse (medii lichide) incubate 10 zile la temperatura de 25-27 °C - fara extract de compost vs cu extract de compost

Conform invenției, procedeul biotehnologic pentru obținere a unui mediu de cultivare *in vitro* a ciupercilor din specia *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel se desfășoară în două etape astfel:

- Prima etapă se referă la obținerea și propagarea culturilor-mamă pe medii agarizate cu formula/compoziția îmbunătățită cu extract de compost specific cultivării ciupercilor *Agaricus bisporus*

Este cunoscut faptul că cele două mari grupuri de ciuperci cultivate, *Agaricus spp.* (champignon) și *Pleurotus spp* (bureți), au mecanisme de nutriție și sisteme enzimatică aferente diferite, tehnologii de cultivare diferite. Ciupercile de tip champignon necesită introducerea în compostul pentru cultivarea lor de dejecții de animale - cai sau/și păsări – pentru a completa necesarul de azot specific metabolismului și enzimelor proprii.

Ciupercile *Pleurotus* nu au aceste cerințe, ele dezvoltându-și în timp capacitatea de a crește pe substraturi lignocelulozice (lemn, paie, deșeuri vegetale diverse, etc.) care sunt, prin natura lor, sărace în azot, structurile lor fiind bogate în schimb în carbon – celuloză, hemiceluloză, lignină. Raportul optim C/N caracteristic pentru substraturile de cultivare ale ciupercilor *Agaricus bisporus* este de 15:1, în timp ce la substratul de cultură pentru ciupercile *Pleurotus* prezintă o plajă largă de 40-80:1, deci puțin azot necesar.

Se cunoaște că ciupercile de tip champignon (ex. *Agaricus bisporus*) sunt cultivate pe un substrat mixt pe bază de paie de grâu, gunoi de grajd/dejecții de cal sau de pasăre, ipsos și apă. Compostul gata preparat are un pH de 6,5 – 6,7, un raport C/N de 13:1 și un conținut de azot total de 2.6-2,7% s.u.

Extractul de compost, conform invenției, se prepara astfel:

- se cântăresc 200 g compost gata preparat și măcinat cu particule ≤ 1 mm;
- se lasă la macerat într-un vas cu 2.0 l apă distilată timp de 4 ore la temperatura de 25°C,
- amestecându-se de 2-3 ori;

- se strecoară prin sită fină, iar lichidul rezultat se filtrează la vid;
- depozitul solid rămas se resuspendă în 0,5 l lichid din prima extracție și se fierbe 10 min;
- se filtrează din nou, iar lichidul rezultat se amestecă împreună cu primul;
- extractul obținut poate fi păstrat 1-2 zile la frigider (2-4°C)

Astfel obținut, extractul de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus* ca supliment organic complex va livra mediului de cultură folosit *in vitro* pentru miceliile tulpinei de *P. eryngii* macroelemente esențiale pentru creștere și dezvoltare - N, P, K dar și microelemente cu rol fiziologic.

Extractul de compost astfel preparat este utilizat în ambele etape ale tehnologiei de producere a miceliului *in vitro*, deci atât la obținerea culturilor-mamă pe medii agarizate cât și la producerea inoculului/miceliului lichid în culturi submerse – pentru biomasă miceliană. Schematic, procedeul este prezentat în fig. 1.

Materialul biologic - reprezentat de culturi pure (culturi-stock) aparținând unor tulpini din specia *Pleurotus eryngii* din Colecția de germoplasmă fungică a ICDLF Vidra.

Culturile-stock, realizate pe plăci Petri (Ø 90 mm) cu mediu solid agarizat cu extract de cartofi (potato dextrose agar -PDA), cu pH inițial 6,5 sunt incubate la 24-26°C la întuneric timp de 8-10 zile, până la acoperirea totală a suprafeței mediului de cultură.

Pentru realizarea culturilor-mamă pe mediu nutritiv cu extract de compost, conform invenției, se procedează astfel:

- se prepară extractul de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus*;
- se prepară mediul de cultură solid (agarizat): extract de cartofi 2,4% + extract de malț 1,7% + extract de compost 50 ml /L + agar 2%;
- mediul nutritiv se aduce la valoarea de pH 6,5 și se repartizează în flacoane de 500/1000 ml cu dop;
- mediul repartizat în flacoane Erlenmeyer se sterilizează în autoclav 20 min la 121°C;
- mediul sterilizat se scoate din autoclav și se repartizează în plăci Petri (Ø 90 mm), câte 15-18 ml mediu/placă; operațiunea se execută în condiții sterile la hota cu flux de aer laminar filtrat (filtre HEPA);
- după 24 ore, plăcile Petri cu mediu solid agarizat sunt inoculate, la hota sterilă cu flux laminar: în mijlocul fiecărei plăci Petri se dispune câte un fragment rotund de

inocul cu Ø 5 mm recoltat cu preduceaua (cork borer) de la marginile coloniilor miceliene ale culturilor-stock din colecție;

- plăcile inoculate sunt incubate timp de 10-12 zile la 25-27°C (incubator/termostat), până când miceliile în creștere acoperă întreaga suprafață a mediilor de cultură;
- în perioada de incubare sunt efectuate observații și măsurători privind creșterea miceliului și caracterele culturale ale coloniilor dezvoltate pe plăcile cu mediu nutritiv agarizat;
- plăcile Petri care la finalul perioadei de incubare etalează colonii miceliene cu caractere atipice, creștere lentă, posibile contaminări cu microorganisme competitori/parazite sunt îndepărtate;
- plăcile cu micelii care prezintă caracteristici culturale morfo-fiziologice normale, identice cu cele ale culturilor-mamă, tipice pentru tulpina și specia de ciuperci utilizată, confirmând vitalitate, vigoare, integritate fenotipică și omogenitate între replicatele surori - sunt selectate în vederea propagării și/sau folosirii lor la obținerea de biomasă miceliană cu utilizări multiple.

Efectul adăugării extractului de compost comparativ cu influența altor surse de C și N în compoziția mediilor solide agarizate verificate în cadrul experimentelor întreprinse se poate observa în fig. 2, - fig. 3 (grafic) și fig 4 (foto) - fig.5 (grafic).

În fig. 2. și fig. 3 este redat efectul extractului de compost asupra creșterii miceliilor de *P. eryngii* pe medii agarizate. Materialul biologic a fost incubat timp de 7 zile la temperatura de 25 -27 °C pe plăci Petri (Ø 90 mm). Dintre cele 6 variante de mediu nutritiv agarizat, doar variantele V4 și V5 conțin extract de compost:

V₀: mediu cu extract de cartofi 2,4% + agar 2%

V₁: mediu cu extract de malț 1,7% + agar 2%

V₂: mediu cu extract de cartofi 2,4% + extract de drojdie 1 g/L + agar 2%

V₃: mediu cu extract de cartofi 2,4% + extract de malț 1,7% + agar 2%

V₄: mediu cu extract de cartofi 2,4% + extract de compost 50 ml /L + agar 2%

V₅: mediu cu extract de cartofi 2,4% + extract de malț 1,7% + extract de compost 50 ml /L + agar 2%

V₆: mediu cu extract de cartofi 2,4% + extract de malț 1,7% + K₂HPO₄ 1 g/L + agar 2%.

În cazul mediilor solide agarizate rezultatele cele mai bune le-a prezentat, la toate cele 3 tulpini, varianta de mediu cu extract de compost, V₅ : mediu cu extract de cartofi 2,4% + extract de malț 1,7% + extract de compost 50 ml /L + agar 2%

Cea mai mare valoare a ratei de creștere a miceliului a fost înregistrată la tulpina PeM-41: 32,66 mm pe varianta cu extract de compost V₅, depășind varianta martor Pe-M39/V₀ (17,83 mm) cu 14,83 mm (183%), rezultat foarte semnificativ asigurat statistic.

A doua etapă a procedurii de propagarea/subcultivarea submersă a miceliilor în mediu lichid, conform invenției, pentru utilizare ca inocul/miceliu lichid sau pentru obținerea de biomasă miceliană/fungică constă în următoarele:

- se prepară extractul de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus*, conform invenției;
- se prepară mediul de cultură lichid: extract de cartof 2,4% + extract de drojdie 2 g/L + K₂HPO₄ 1 g/L + extract de malț 2 g/L + fructoză 10 g/L + extract de compost 50 ml/L; se aduce indicele pH la valoarea de 6,5;
- mediul lichid preparat se repartizează în flacoane Erlenmeyer închise cu dop (vată/polipropilenă);
- flacoanele cu mediu se sterilizează în autoclav 20 min la 121°C;
- flacoanele cu mediul sterilizat se scot din autoclav și se lasă să se răcească într-o incintă sterilă;
- după răcirea lor sub 28°C, flacoanele cu mediu lichid sunt inoculate la hota cu flux laminar cu miceliu provenit din culturile-mamă pregătite în etape anterioară, respectiv cu câte 4-5 fragmente rotunde de miceliu recoltate cu preduceaua de Ø 5 mm (pot fi și mai mari) din marginile coloniilor miceliene ale culturilor-mamă; pot fi utilizate și mai multe fragmente de inocul, în funcție de capacitatea/volumul flacoanelor cu mediu lichid utilizate;
- flacoanele cu mediu lichid inoculat sunt incubate pe agitatorul orbital cu 100 rpm la întuneric timp de 14 zile, la 25-27°C;
- pe toată perioada incubării sunt efectuate observații privind creșterea și morfologia maselor miceliene submerse;
- pentru obținerea și evaluarea biomasei rezultate la sfârșitul perioadei de creștere activă a miceliilor tulpinilor testate, acestea sunt, mai întâi, separate de lichidul din flacoane prin filtrare;

- biomasa obținută se spală de mai multe ori cu apă distilată;
- biomasa este apoi deshidratată (uscată) la etuvă timp de cca. 36 ore la 40°C, până când masa cântărită rămâne constantă; un alt procedeu este cel al liofilizării ;
- prin cântărire la balanță se determină, pentru fiecare probă greutatea biomasei înainte și după uscarea la etuvă;
- rezultatele obținute în urma evaluării cantitative a biomasei fungice, proaspătă și uscată, sunt înregistrate ca atare – raportate la cantitatea de mediu lichid din vasul/flaconul de cultivare sau, aceste valori se pot raporta la 1000 ml mediu.

În fig 7 și 8 este redat efectul extractului de compost asupra creșterii miceliilor de *P. eryngii* în cultură submersă pe medii nutritive lichide (foto).

Efectul adăugării extractului de compost comparativ cu influența altor surse de C și N în compoziția mediilor lichide verificate în cadrul experimentelor întreprinse este bine reprezentat în graficul din fig. 6.

Varianta de mediu lichid V₇ (mediu cu extract de cartof 2,4% + extract de drojdie 2 g/L + K₂HPO₄ 1 g/L + extract de malț 2 g/L + fructoză 10 g/L + extract de compost 50 ml/L), singura la care mediul nutritiv a fost suplimentat cu extract de compost, a susținut creșterea cea mai mare pentru biomasa miceliană a ambelor tulpini de *P. eryngii* verificate.

Cel mai bun rezultat a fost realizat de tulpina PeM-41 pe varianta de mediu nutritiv lichid V₇, cantitatea medie de biomasă uscată obținută după 14 zile de incubare și raportată la 1000 ml soluție nutritivă fiind de 7,029 g, cu un surplus de 4.25 g (152,93%) față de martorul PeM-41/V₁, care a dat doar 2,779 g în condițiile experimentale. Adăugarea extractului de compost (50 ml/L) asigură variantei PeM-41/V₇ un surplus de biomasă uscată de 1,082 g/L (18,15%) față de varianta similară, dar fără extract de compost, PeM-41/V₆.

REVENDICARI

1 - Procedeu biotehnologic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*, caracterizat prin aceea că se prepară un extract de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus* folosind 200 g compost gata preparat și măcinat cu particule ≤ 1 mm; care se lasă la macerat într-un vas cu 2.0 l apă distilată timp de 4 ore la temperatura de 25°C, amestecându-se de 2-3 ori; acesta se strecoară prin sită fină, iar lichidul rezultat se filtrează la vid; depozitul solid rămas se resuspendă în 0,5 l lichid din prima extracție și se fierbe 10 min; se filtrează din nou, iar lichidul rezultat se amestecă împreună cu primul; extractul obținut poate fi păstrat 1-2 zile la frigider (2-4°C) ca supliment organic complex și se folosește atât în etapa obținerii și propagării culturilor-mamă pe medii agarizate cât și în etapa tehnologică a propagării/subcultivării submerse a miceliilor, în mediu lichid, pentru utilizare ca inocul/miceliu lichid sau pentru obținerea de biomasă miceliană/fungică.

2 - Procedeu biotehnologic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că pentru cultura-mamă pe mediu nutritiv cu extract de compost se procedează astfel:

- se prepară extractul de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus*;
- se prepară mediul de cultură solid (agarizat): extract de cartofi 2,4% + extract de malț 1,7% + extract de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus* 50 ml /L + agar 2%;
- mediul nutritiv se aduce la valoarea de pH 6,5 și se repartizează în flacoane de 500/1000 ml cu dop care se sterilizează în autoclav 20 min la 121°C;
- mediul sterilizat se scoate din autoclav și se repartizează în plăci Petri (\varnothing 90 mm), câte 15-18 ml mediu/placă; operațiunea se execută în condiții sterile la hota cu flux de aer laminar filtrat;
- după 24 ore, plăcile Petri cu mediu solid agarizat sunt inoculate, la hota sterilă cu flux laminar: în mijlocul fiecărei plăci Petri se dispune câte un fragment rotund de inocul cu \varnothing 5 mm recoltat de la marginile coloniilor miceliene ale culturilor-stock din colecție;

- plăcile inoculate sunt incubate timp de 10-12 zile la 25-27°C (incubator/termostat), până când miceliile în creștere acoperă întreaga suprafață a mediilor de cultură; rata de creștere a miceliului este de 183%, pe varianta cu extract de compost față de varianta mart, după 7 zile de la inoculare la temperatura de 25 -27 °C.

3 - Procedeu biotehnologic de optimizare a ratei de creștere a miceliilor din tulpini de *Pleurotus eryngii* pentru sporirea cantității de biomasă miceliană obținută *in vitro*, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că pentru propagarea/subcultivarea submersă a miceliilor în mediu lichid se procedează astfel:

- se prepară extractul de compost pentru ciupercile *Agaricus bisporus*,
- se prepară mediul de cultură lichid: extract de cartof 2,4% + extract de drojdie 2 g/L + K₂HPO₄ 1 g/L + extract de malț 2 g/L + fructoză 10 g/L + extract de compost 50 ml/L și se aduce indicele pH la valoarea de 6,5;
- mediul lichid preparat se repartizează în flacoane Erlenmeyer închise cu dop (vată/polipropilenă);
- flacoanele cu mediu se sterilizează în autoclav 20 min la 121°C; se scot din autoclav și se lasă să se răcească la o temperatură sub 28°C într-o incintă sterilă;
- flacoanele cu mediu lichid sunt inoculate la hota cu flux laminar cu miceliu provenit din culturile-mamă pregătite conform revendicării 2, respectiv cu câte 4-5 fragmente rotunde de miceliu recoltate cu Ø 5 - 10 mm din marginile coloniilor miceliene ale culturilor-mamă;
- flacoanele cu mediu lichid inoculat sunt incubate pe agitatorul orbital cu 100 rpm la întuneric timp de 14 zile, la 25-27°C;
- miceliile tulpinilor testate sunt separate de lichidul din flacoane prin filtrare;
- biomasa obținută se spală de mai multe ori cu apă distilată;
- biomasa este apoi deshidratată (uscată) la etuvă timp de cca. 36 ore la 40°C, până când masa cântărită rămâne constantă; sau este liofilizată ;
- rata de creștere a cantității de biomasă uscată este de 152,93% raportată la 1000 ml soluție nutritivă față de varianta martor.

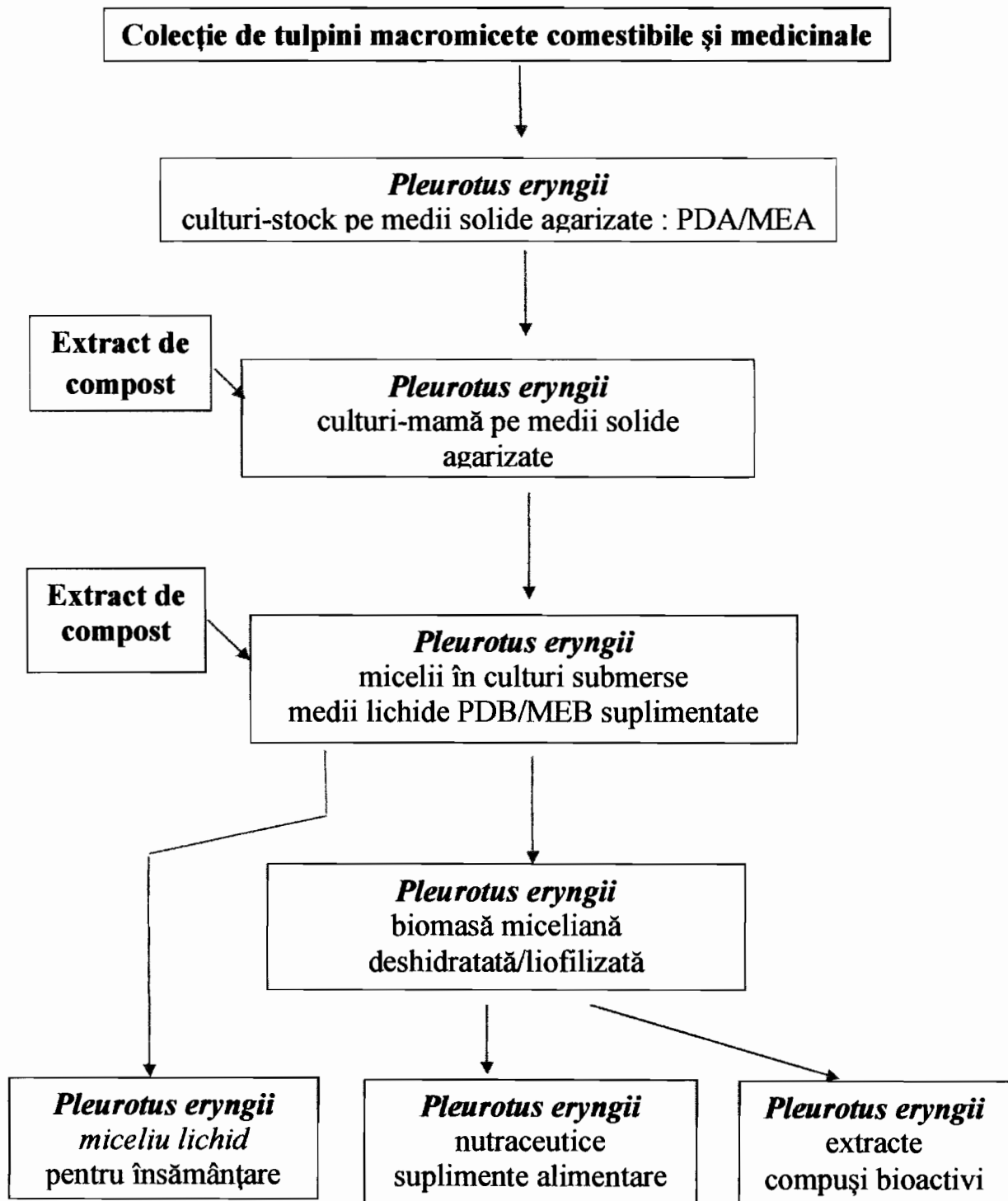


Fig. 1

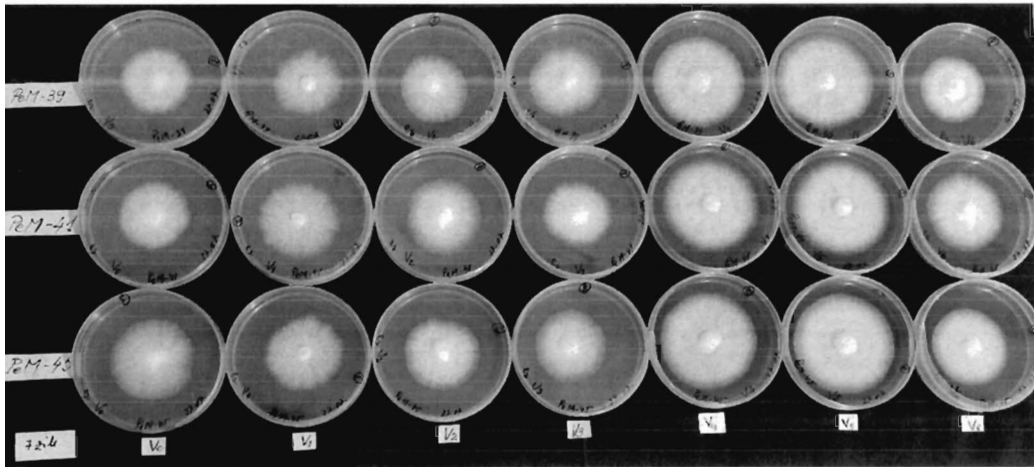


Fig. 2

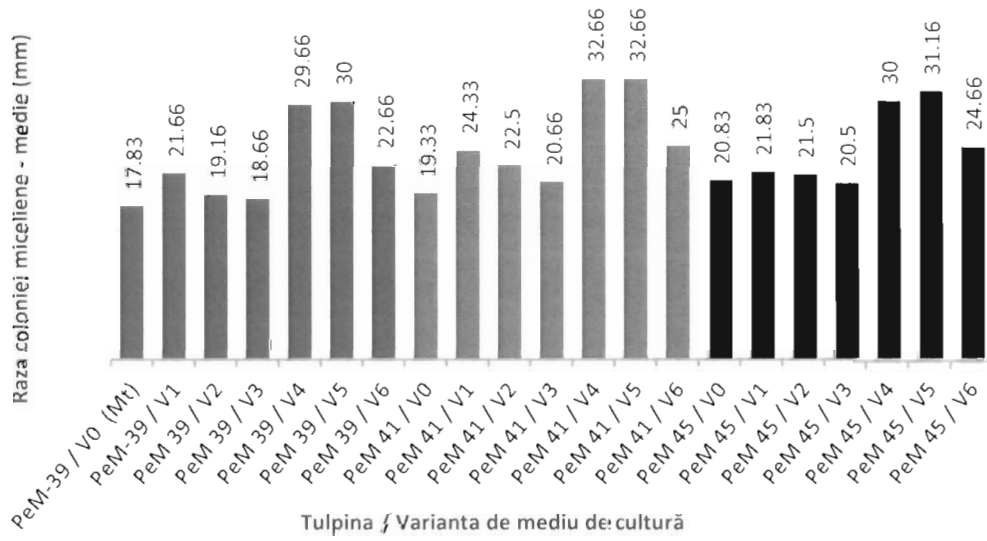


Fig. 3

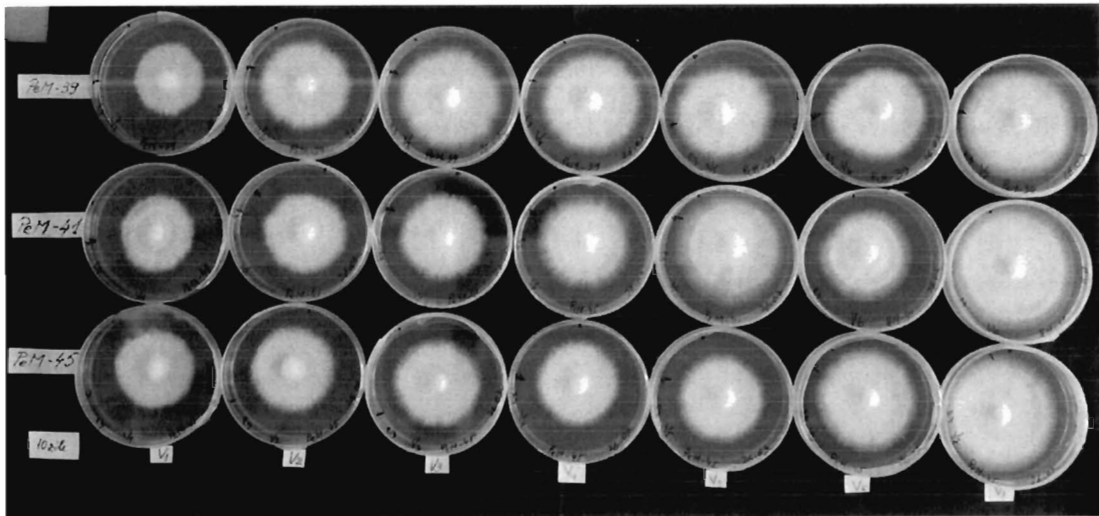


Fig. 4

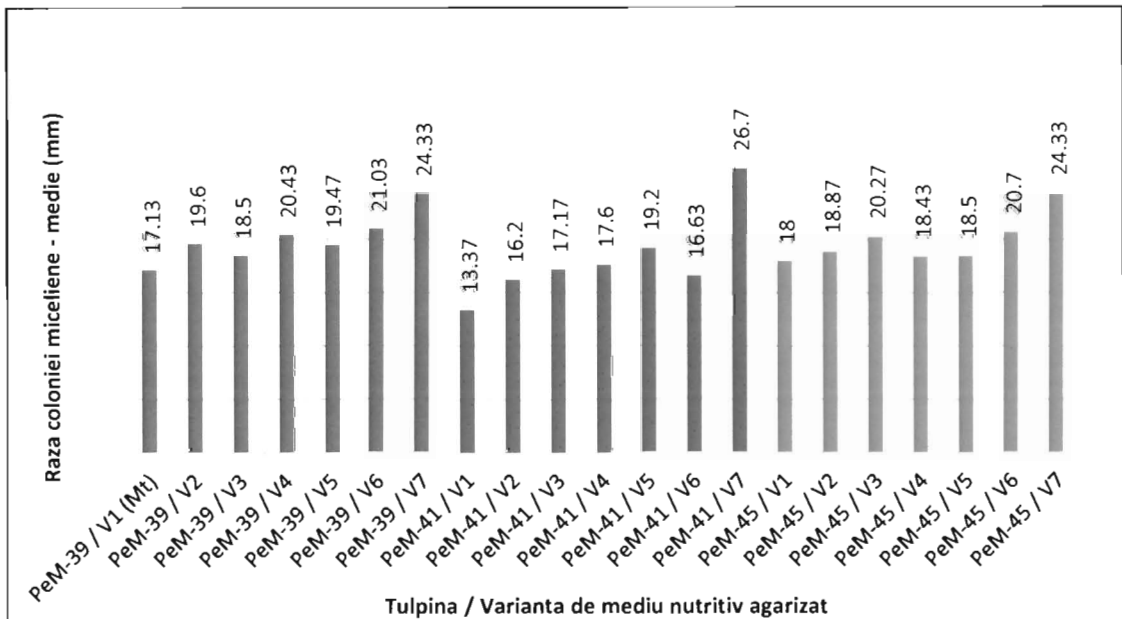


Fig. 5

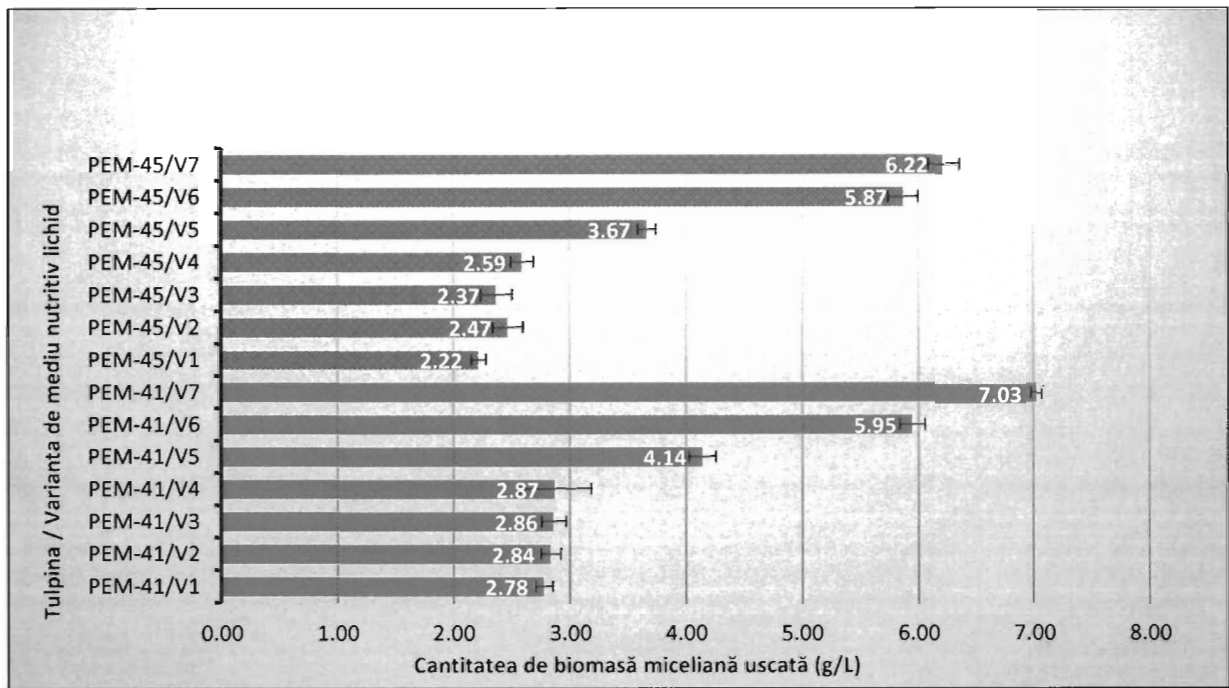


Fig. 6

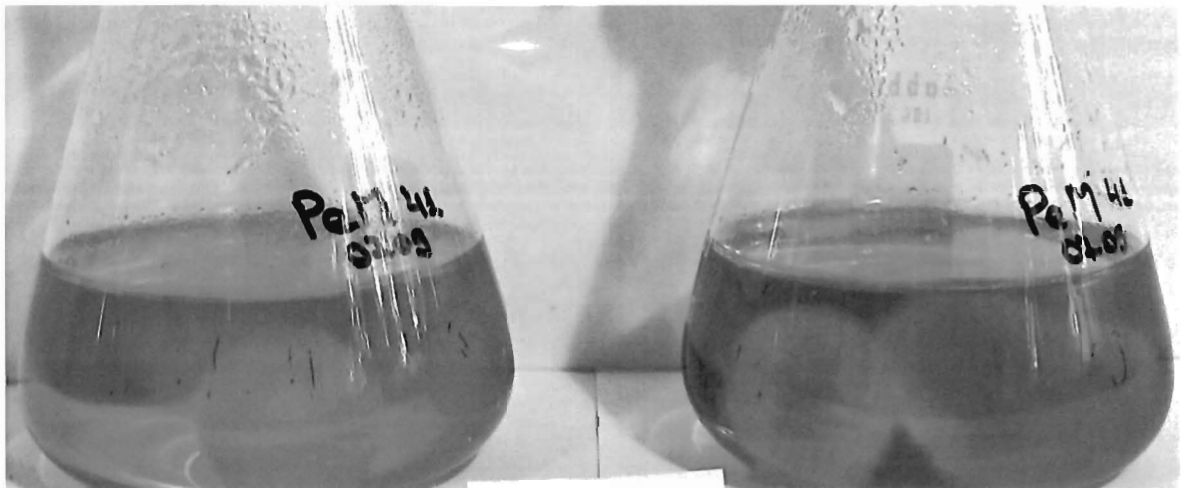


Fig. 7

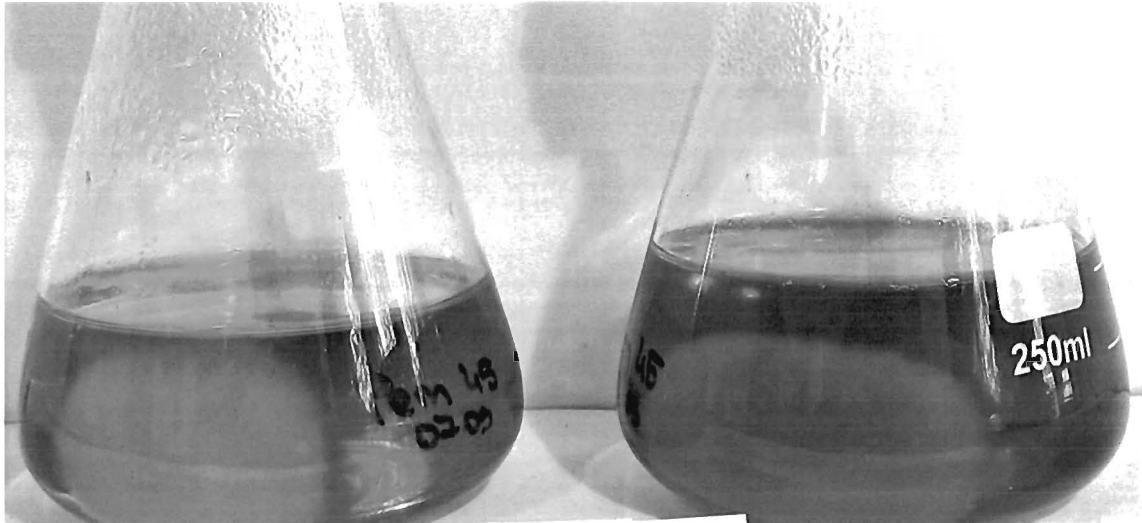


Fig. 8