

Invenția se referă la tulpinile de microorganisme producătoare de substanțe bioactive, în special la tulpinile din genul *Pseudomonas*, ce pot fi utilizate în industria microbiologică, pentru obținerea enzimelor lipolitice.

Este cunoscut faptul că bacteriile din genul *Pseudomonas* posedă o activitate lipolitică diversă. Enzimele lipolitice au o importanță mare, deoarece ele scindează grăsimile diverse și din această cauză au un spectru larg de aplicare (în prezent sunt utilizate în aproximativ 10-12 ramuri ale economiei naționale).

Este cunoscută tulpina *Ps. mendocina* ce face parte din componența microflorei concomitente a algei verzi halofile, monocelulare *Dunaliella salina* [1, 2].

Dezavantajul acestei tulpini este că ea posedă o cantitate insuficientă de fermenți lipolitici și alte substanțe bioactive. Se mai cunoaște tulpina *Pseudomonas fluorescens* 533 care poate fi considerată ca un producător de enzime lipolitice [2, 3]. Activitatea lipazelor în lichidul cultural constituie 800 mM/mg. Tulpina poate fi cultivată în mediul organic Ching B (agarizat sau lichid).

Dezavantajul acestei tulpini constă în faptul că ea posedă o activitate lipolitică insuficientă și nu poate fi cultivată pe medii minerale sau pe mediile nutritive lichide care au fost deja utilizate.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unei tulpini noi din genul *Pseudomonas* care ar asigura o productivitate sporită a enzimelor lipolitice și ar necesita minimum de cheltuieli pentru cultivare.

Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă *Pseudomonas sp. 1*, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme a Republicii Moldova (Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova) sub numărul CNM-PsB-01 care reprezintă o sursă de substanțe bioactive.

Rezultatul tehnic al invenției constă în:

- * obținerea unui complex de enzime lipolitice cu o activitate de 1661 mM/mg;
- * posibilitatea cultivării tulpinii pe medii de acum utilizate (lichidul cultural după 5 zile de creștere a *Dunaliella salina*), ceea ce permite de a folosi mediul Ben-Amoț, care deja a fost utilizat. Pentru cea mai apropiată soluție se pregătește de fiecare dată un mediu nou, ceea ce este neeconom și răpește mai mult timp.

Rezultatul tehnic obținut se datorește particularităților biochimice ale tulpinii, în special a proceselor anabolice și catabolice, care decurg în acest organism.

Tulpina propusă a fost izolată în cultură pură din microflora concomitentă a algei verzi, halofile, unicelulare *Dunaliella salina* Teod. CALU-834 și poate fi cultivată pe mediu mineral și organic.

Pentru creșterea și dezvoltarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv mineral deja cunoscut Ben-Amoț care conține, g/l [4]: NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; MgSO₄•7H₂O - 0,75; KCl - 0,15; FeEDTA - 0,05 ml (soluț. 0,05M); microelemente, sau lichidul cultural al algei *Dunaliella salina*, la care se adaugă zahăr - 5,00, autolizat de drojdie - 10,00.

Activitatea lipolitică medie a tulpinii propuse constituie 1661 mM/mg.

Caracterizarea cultural morfologică a tulpinii: reprezentant al bastonașelor gram-negative, strict aerobe, mobile. Celule solitare, baciliforme, cu dimensiunile de 0,5-1 x 1,5-4 mm. Nu formează capsule. În medii nutritive depuse formează colonii circulare, vâscoase, de culoare albă, netede-lucioase cu emulsionare totală în apă, turbiditate uniformă. Aspectul marginii - întreagă, profilul ușor convex. Aspectul coloniei - S. Se sintetizează pigmentul verde-galben, fluorescent în ultraviolet.

Caracterizarea fiziologo-biochimică:

Tulpina bacteriei *Pseudomonas sp. 1* crește bine pe mediul cu următoarea compoziție (în g/l): NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; MgSO₄•7H₂O - 0,75; KCl - 0,15; FeEDTA - 0,05 ml (soluț. 0,05M); zahăr - 5,0; autolizat de drojdie - 10,0; microelemente.

Tulpina se caracterizează printr-o activitate lipolitică extracelulară înaltă. Activitatea maximală a fermenților lipolitici se constată în a 4-a zi de cultivare a bacteriilor.

Hemoorganotrofa. Crește la temperatura +5°C și nu se observă creșterea la +42°C. Temperatura optimă de dezvoltare 24...26°C. Tulpina nu crește în prezența BaCl₂ în concentrație de 10 g/l. Metabolism de tip respirator. Catalazopozitivă. Oxidazopozitivă. Drept sursă de carbon pentru dezvoltare poate servi: zaharoza, maltoza, glucoza, lactoza, manitolul îl scindează slab. Nu scindează gelatina. Tulpina nu este rezistentă la următoarele antibiotice: eritromicină, streptomycină, lincomicină și rezistă la oxacilină, ampicilină, ristampicină. Formează lipaza. Reacția la indol - pozitivă.

Gradul de puritate a tulpinii.

Tulpina *Pseudomonas sp. 1* a fost izolată în cultură pură din microflora concomitentă a algei verzi, halofile *Dunaliella salina* Teod CALU834. Pentru cultivare necesită condiții sterile, în caz contrar poate fi infectată de alte microorganisme (bacterii, ciuperci, drojdii).

Tulpina poate crește fără inhibarea proceselor de divizare în intervalul de pH 5,5...8,4. La pH-ul mediului de 3,8 tulpina cu crește.

Exemplul 1

Mediu nutritiv cu următoarea compoziție (în g/l): NaCl - 120; NaHCO₃ - 2,0; NaNO₃ - 0,5; KH₂PO₄ - 0,05; MgSO₄•7H₂O - 0,75; KCl - 0,15; FeEDTA - 0,05 ml (soluț. 0,05M); zahăr - 5; autolizat de drojdie - 10; microelemente Trilon B - 0,0025; MnSO₄•7H₂O - 0,0015; MoO₃ - 0,0002; CuSO₄•5H₂O - 0,00004; ZnSO₄•7H₂O - 0,00025, apă distilată - restul. Se sterilizează în autoclavă la 0,5 atm., în decurs de 1 oră. Apoi în acest mediu se

inoculează 0,5 g/l de biomasă absolut uscată a tulpinii *Pseudomonas sp.* 1. Cultivarea are loc în termostat la temperatura de 22...26°C în decurs de 4 zile.

Exemplul 2

Într-o colbă conică de 100 ml se introduc 50 ml de lichid cultural al algei verzi *Dunaliella salina* Teod CALU834 după 5 zile de cultivare. Se adaugă 5 g/l zahăr și 10 g/l de autolizat de drojdie. Mediul pregătit se sterilizează la 0,5 atm. în decurs de 1 oră. Apoi în acest mediu se inoculează 0,5 g/l biomasă absolut uscată. Cultivarea are loc la temperatura 22...26°C. Activitatea lipolitică după 4 zile de cultivare constituie 1800 mM/mg.