



MD 3212 F1 2006.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3212** (13) **F1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/785 (2006.01)
C01G 51/00 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2005 0279 (22) Data depozit: 2005.09.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.12.31, BOPI nr. 12/2006
(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: COREȚCHI Liuba, MD; EMNOVA Ecaterina, MD; BAHNAREL Ion, MD; SPÎNU Constantin, MD; CECHIRLAN Natalia, MD	
(73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) **Tulpină de fungi *Mucor vulgaris* X Mich. pentru solubilizarea compușilor
insolubili ai cobaltului**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la
o tulpină de fungi.

Se propune tulpina de fungi *Mucor vulgaris* X
Mich., depozitată în Colecția Națională de

2
5 Microorganismele Neapatogene cu numărul CNMN-
FD-07, ce posedă proprietatea de solubilizare a
compușilor insolubili ai cobaltului.
Revendicări: 1

10

MD 3212 F1 2006.12.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la o tulpină de fungi.

Este cunoscută utilizarea tulpinilor din genul *Mucor circinelloides* pentru producerea enzimelor din sistemul celulelor (endogluconazele, celobiohidrolazele și β -glucozidazele) [1].

5 Este cunoscută utilizarea tulpinii *Aspergillus niger* în solubilizarea compușilor insolubili, inclusiv a fosfatului de cobalt, în acest scop tulpina se inoculează pe mediu malț-agar suplimentat cu fosfat de cobalt [2].

Însă solubilizarea fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Aspergillus niger* este mai puțin efectivă, fiind exprimată prin diametrul mic al zonei de solubilizare.

10 Problema pe care o soluționează invenția constă în solubilizarea compușilor insolubili din roci, minereuri, depozite de deșeuri și din locuri contaminate (inclusiv cu radionuclizi) prin utilizarea tulpinii *Mucor vulgaris* X Mich. Mecanismele în cauză constituie componenți ai ciclurilor bio-geo-chimice ale radionuclizilor și merită atenție în monitorizarea contaminării mediului ambiant, inclusiv cu radionuclizi. Pe lângă aceasta, biotehnologiile bazate pe tulpina *Mucor vulgaris* X Mich. prezintă interes ca metode potențiale de tratare a

15 locurilor contaminate și de solubilizare a compușilor insolubili din roci și minereuri. Dezavantajele menționate sunt înlăturate prin aceea că se propune utilizarea tulpinii de microorganisme *Mucor vulgaris* X Mich. CNMN-FD-07 în calitate de agent de solubilizare a compușilor insolubili, inclusiv a fosfatului de cobalt.

20 Tulpina *Mucor vulgaris* X Mich. CNMN-FD-07 este un microorganism autotrof, capabil să transforme substanțele neorganice în compuși organici. Ea sintetizează acizi organici care contribuie la solubilizarea compușilor insolubili, de exemplu a fosfatului de cobalt, și la transformarea lor în compuși organici (oxalați), care imobilizează metalul, exprimat prin formarea zonei de solubilizare în jurul coloniei tulpinii.

25 Izolarea fungilor s-a efectuat din sol și din rizosfera plantulelor de soia. Pentru izolarea fungilor din sol la 1 g de sol s-au adăugat 100 ml H₂O bidistilată sterilă. După agitare, timp de o oră, s-au efectuat 10 diluții cu apă distilată sterilă până la concentrația de 10⁻⁵. Câte 0,1 ml soluție din fiecare diluție au fost împrăștiate pe suprafața cutiilor Petri cu mediu must-agar. La a 4-a zi din coloniile care creșteau pe suprafața mediului must-agar s-au transferat bucăți mici de miceliu în eprubete cu mediu must-agar. În scopul izolării fungilor din rizosfera plantulelor de soia, spălate bine, ținute timp de 25 min în KMnO₄, 2 min în alcool etilic au fost plasate pe cutii Petri cu mediu must-agar și incubate la temperatura de 25°C timp de 5 zile la întuneric.

30 Identificarea microorganismelor agentului s-a efectuat conform metodelor descrise în sursele: A.A. Милько. Определитель мукоральных грибов. Киев, Наукова Думка, 1974, 302 с., Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Ленинград, Наука, 1967, 301 с. Caracteristicile morfologoculturale ale tulpinii *Mucor vulgaris* X utilizate sunt descrise în: A.A. Милько. Определитель мукоральных грибов. Киев, Наукова Думка, 1974, с. 178-179.

35 Testarea izolatelor. Tulpinile fungice au fost crescute în mediul must-agar (10 cm³), ingredientele fiind luate în următorul raport pentru 1l:

must de bere 250 ml

apă distilată 750 ml

agar-agar 20 g,

40 și mediul must-agar suplimentat cu compusul fosfatului de cobalt cu concentrația de 0,5...1,5% în cutii Petri cu diametrul de 90 mm. Inocularea s-a efectuat cu discuri de miceliu având diametrul de 7 mm, tăiate din coloniile crescute pe mediu must-agar la temperatura de 25°C timp de 2...3 zile. Pentru fiecare variantă s-au efectuat trei și mai multe repetări. Cutiile Petri s-au incubat la temperatura de 25°C. S-a măsurat diametrul coloniei ciupercii în dezvoltare și diametrul zonei de solubilizare din jurul coloniei.

45 S-a efectuat testarea unui set (n=46) de tulpini fungice. Evaluarea calitativă a potențialului tulpinilor de fungi de a produce acizi organici s-a efectuat prin determinarea evoluției diametrului coloniei fungice și diametrul de extindere a zonei de solubilizare peste 24, 48, 72, 94 ore de cultivare pe mediul must-agar (martor) și mediul must-agar suplimentat cu compusul metalic fosfat de cobalt în concentrație de 0,5...1,5%.

Exemplul 1

50 Tulpina *Mucor vulgaris* X a fost crescută în cutii Petri pe mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi coloniile mici de *Mucor vulgaris* X cu diametrul de 7,0 mm au fost folosite pentru inocularea în mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt în concentrație de 0,5%, apoi incubat la temperatura de 25...26°C.

55 Începând cu a doua zi s-a înregistrat diametrul coloniei tulpinii *Mucor vulgaris* X și diametrul zonei de solubilizare. Pentru varianta martor s-a inoculat tulpina *Mucor vulgaris* X în mediul must-agar. Activitatea tulpinii *Mucor vulgaris* X a fost elucidată prin înregistrarea diametrului coloniei tulpinii *Mucor vulgaris* X și diametrului zonei de solubilizare. Diametrul coloniei de solubilizare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Mucor vulgaris* X a constituit 90,0 ± 0 mm, fiind cu 10,0 mm mai mare decât în cazul acțiunii tulpinii *Aspergillus niger*, deci s-a obținut o creștere cu 112,5% față de soluția cea mai apropiată.

Exemplul 2

MD 3212 F1 2006.12.31

4

5 Tulpina *Mucor vulgaris X* a fost crescută în cutii Petri pe mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi coloniile mici de *Mucor vulgaris X* cu diametrul de 7 mm au fost inoculate în mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt în concentrație de 1,5%, incubat apoi la temperatura 25...26°C. Începând cu a doua zi s-a înregistrat diametrul coloniei tulpinii *Mucor vulgaris X* și diametrul zonei de solubilizare. Pentru varianta martor s-a

10 *Exemplul 3*

Tulpina *Mucor vulgaris X* a fost crescută în cutii Petri pe mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi coloniile mici de *Mucor vulgaris X* cu diametrul de 7 mm au fost inoculate în mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt în concentrație de 1,5%, incubat la temperatura de 25...26°C.

15 Începând cu a doua zi s-a înregistrat diametrul coloniei tulpinii *Mucor vulgharis X* și diametrul zonei de solubilizare. Pentru varianta martor s-a inoculat tulpina *Mucor vulgaris X* în mediul must-agar. Activitatea tulpinii a fost elucidată prin înregistrarea diametrului coloniei tulpinii și a zonei de solubilizare. Diametrul coloniei de solubilizare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Mucor vulgaris X* a constituit $77,5 \pm 18,75$ mm, fiind cu 14,5 mm mai mare decât în cazul acțiunii tulpinii *Aspergillus niger*, deci s-a obținut o creștere cu 123,5% față de soluția cea mai apropiată.

20 Datele privind eficiența tulpinii propuse sunt expuse în tabel, unde sunt prezentate datele comparative ale activității tulpinii *Mucor vulgaris X* și *Aspergillus niger* referitor la solubilizarea fosfatului de cobalt.

Tabel

Influența unor microorganisme asupra solubilizării fosfatului de cobalt

Nr. d/o	Tulpină	Variantă, concentrație	Diametrul zonei de solubilizare a fosfatului de cobalt, mm	Eficiența față de soluția cea mai apropiată, %
1	<i>Aspergillus niger</i>	Martor, mediu must-agar	-	
		Must-agar + fosfat de cobalt 0,5%	$80,0 \pm 0$	
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,0%	$44,0 \pm 6,5$	
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,5%	$63,0 \pm 7$	
2	<i>Mucor vulgaris X</i>	Martor, mediu must-agar	-	
		Must-agar + fosfat de cobalt 0,5%	$90,0 \pm 0^x$	112,5
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,0%	$63,75 \pm 6,25^x$	144,8
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,5%	$77,5 \pm 18,75^x$	123,0

25

Notă: x – diferența dintre diametrele zonei de solubilizare a fosfatului de cobalt de către tulpina *Mucor vulgaris X* față de *Aspergillus niger* 70 este autentică pentru $P < 0,5$.

MD 3212 F1 2006.12.31

5

(57) Revendicare:

5 Tulpină de fungi *Mucor vulgaris* X Mich. CNMN-FD-07 pentru solubilizarea compușilor insolubili ai cobaltului.

(56) Referințe bibliografice:

1. SAHA B.C. Endoglucanaze From A Newly Izolated Strain Of *Mucor Circinelloides*. American Chemical Society. 2004, Biot. 233
2. SAYER J.A., RAGGETT S.L., GADD G.M. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Micological Research*, 1995, 99 (8), p. 987-993

Director adjunct Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria