



MD 3212 G2 2006.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3212** (13) **G2**  
(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12R 1/785* (2006.01)  
*C01G 51/00* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(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; SPINU 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 Microorganisme Nematogene cu numărul CNMN-FD-07, ce posedă proprietatea de solubilizare a compușilor insolubili ai cobaltului.  
Revendicări: 1

10

MD 3212 G2 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  $\beta$ -glucozidazele) [1].

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.

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 locurilor contaminate și de solubilizare a compușilor insolubili din roci și minereuri.

Dezavantajele menționate sunt înlăturate prin aceea că se propune utilizarea tulpinii de microorganism *Mucor vulgaris* X Mich. CNMN-FD-07 în calitate de agent de solubilizare a compușilor insolubili, inclusiv a fosfatului de cobalt.

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.

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 H<sub>2</sub>O bidistilată sterilă. După agitare, timp de o oră, s-au efectuat 10 diluții cu apă distilată sterilă până la concentrația de 10<sup>-5</sup>. 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 KMnO<sub>4</sub>, 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. 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.

Testarea izolatelor. Tulpinile fungice au fost crescute în mediul must-agar (10 cm<sup>3</sup>), ingredientele fiind luate în următorul raport pentru 1l:

must de bere 250 ml  
apă distilată 750 ml  
agar-agar 20 g,

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.

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 (marmor) și mediul must-agar suplimentat cu compusul metalic fosfat de cobalt în concentrație de 0,5...1,5%.

*Exemplul 1*

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.

Începând cu a doua zi s-a înregistrat diametrul coloniei tulpinii *Mucor vulgaris* X și diametrul zonei de solubilizare. Pentru varianta marmor 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 G2 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. Inceput 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 Inceput 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</i> X	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 G2 2006.12.31

5

5 **(57) Revendicare:**

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

10

**(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