

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

Este cunoscută utilizarea tulpinii *Aspergillus niger* în solubilizarea compușilor insolubili, inclusiv a fosfatului de cobalt, în acest scop tulpina *Aspergillus niger* se inoculează pe un mediu malț-agar suplimentat cu fosfat de cobalt [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție este cunoscută metoda de solubilizare a compușilor insolubili ai cobaltului din roci, minereuri, depozite de deșeuri și din locuri contaminate (inclusiv cu radionuclizi) prin utilizarea tulpinii *Mucor vulgaris* X Mich., depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neptogene cu numărul CNMN-FD-07 [2].

Neajunsul procedurii constă în aceea că solubilizarea fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Mucor vulgaris* X este mai puțin eficientă, fiind exprimată prin diametrul mic al zonei de solubilizare în cultura *in vitro*.

Problema pe care o soluționează invenția constă în sporirea eficienței solubilizării compușilor insolubili ai elementelor radioactive, inclusiv a fosfatului de cobalt din sol.

Esența invenției constă în aceea că se propune o tulpină de fungi *Penicillium viride* 2, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neptogene cu numărul CNMN-FD-09 pentru solubilizarea compușilor insolubili ai cobaltului.

Eficiența tulpinii în concentrație de 1,0% și 1,5% față de soluția cea mai apropiată a constituit 141,2% și 116,1%, respectiv.

Tulpina *Penicillium viride* 2 CNMN-FD-09 sintetizează acizi organici și enzime pectolitice extracelulare, care contribuie la solubilizarea compușilor insolubili, de exemplu a fosfatului de cobalt și transformarea lor în hidroxizi, oxizi sau alți compuși cu o solubilizare joasă, expresată prin formarea zonei de solubilizare în jurul coloniei tulpinii în condiții *in vitro*.

Metoda se realizează în felul următor.

Izolarea fungilor s-a efectuat din sol și din rizosfera plantulelor de soia. Pentru izolarea fungilor din sol la 1 g de sol s-a 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 dispersate 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 plantelor rădăcinuțe 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 25°C timp de 5 zile la întuneric. Identificarea microorganismelor agentului s-a efectuat conform metodelor descrise în sursele (Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Наука, 1967, c. 301).

Testarea izolatelor.

Tulpinile fungicide au fost crescute în 10 cm³ de mediu must-agar, ingredientele fiind luate în următorul raport pentru 1 L:

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

mediul a fost suplimentat cu fosfat 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 cu diametrul de 7 mm, tăiate din coloniile crescute pe mediul must-agar la 25°C timp de 2...3 zile. Pentru fiecare variantă s-au efectuat trei și mai multe repetări. Cutiile Petri s-au incubat la 25°C. S-a măsurat diametrul dezvoltării coloniei ciupercii și diametrul zonei de solubilizare din jurul coloniei.

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

Exemplul 1

Tulpina *Penicillium viride* 2 CNMN-FD-09 se crește în cutii Petri pe un mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi cu colonii mici de *Penicillium viride* 2 CNMN-FD-09 cu diametrul de 7 mm se inoculează mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt în concentrație de 1,0% și se incubează la t=25...26°C. Începând cu a doua zi se înregistrează diametrul coloniei tulpinii *Penicillium viride* 2 și diametrul zonei de solubilizare. Ca martor a servit inocularea cu tulpina *Mucor vulgaris* X a mediului must-agar. Activitatea tulpinii a fost evaluată prin înregistrarea diametrului coloniei tulpinii și a zonei de solubilizare. S-a observat că diametrul coloniei de solubilizare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Penicillium viride* 2 a constituit 90,0 mm. Eficiența față de soluția cea mai apropiată *Mucor vulgaris* X a constituit 141,2%.

Exemplul 2

Tulpina *Penicillium viride* 2 se crește în cutii Petri pe mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi cu colonii mici de *Mucor vulgaris* X cu diametrul de 7 mm se inoculează mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt în concentrație de 1,5% și se incubează la t=25...26°C. Începând cu a doua zi se înregistrează diametrul coloniei tulpinii *Penicillium viride* 2 și diametrul zonei de solubilizare. Ca martor a servit inocularea cu tulpinile *Mucor vulgaris* X a mediului must-agar. Activitatea tulpinii a fost evaluată prin înregistrarea diametrului coloniei tulpinii și a zonei de solubilizare. S-a observat că diametrul coloniei de solubilizare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii

Penicillium viride 2 a constituit 90,0±0 mm. Eficiența față de soluția cea mai apropiată a constituit 116,1%. Datele privind eficiența tulpinii propuse sunt expuse în tabel, unde sunt prezentate datele comparative ale activității tulpinii *Penicillium viride 2* și *Mucor vulgaris X* referitor la solubilizarea fosfatului de cobalt.

Tabelul

Influența unor microorganisme asupra solubilizării fosfatului de cobalt

Nr. d/r	Tulpină	Variantă, concentrație	Diametrul zonei de solubilizare a fosfatului de cobalt, mm	Eficiența față de cea mai apropiată soluție, %
1.	<i>Mucor vulgaris X</i>	Martor, mediu must-agar		
		Musta-agar + fosfat de cobalt 1,0%	63,75±6,25	
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,5%	77,5±18,75	
2.	<i>Penicillium viride 2</i>	Martor, mediu must-agar	-	
		Musta-agar + fosfat de cobalt 1,0%	90,0±0*	141,2
		Musta-agar + fosfat de cobalt 1,5%	90,0±0*	116,1

Notă: * – diferența diametrului zonei de solubilizare a fosfatului de cobalt de către tulpina *Penicillium viride 2* față *Mucor vulgaris X* (soluția cea mai apropiată) este autentică pentru P<0,5.