



MD 3944 C2 2009.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3944** (13) **C2**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/80 (2006.01)
A62D 3/02 (2007.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2008 0259 (22) Data depozit: 2008.10.08</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.07.31, BOPI nr. 7/2009</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CINCILEI Angela, MD; DELORT Anne-Marie, FR; TOLOCICHINA Svetlana, MD; DRAGALIN Ion, MD; BUNESCU Andrei, MD; BESSE-HOGGAN Pascale, FR; SANCELME Martine, FR (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) Tulpină de fungi microscopici *Penicillium corylophilum* - destructoare a atrazinei și benzotiazolilor

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi microscopici din genul *Penicillium*, care poate fi utilizată în industria microbiologică și în scopul protecției mediului ambiant pentru descompunerea xenobioticelor.
Tulpina de fungi microscopici *Penicillium corylophilum* este depozitată în Colecția Națională

2
de Microorganisme Nematogene la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM sub nr. CNMN - FP - 04 și asigură descompunerea concomitentă a atrazinei și benzotiazolilor.
Revendicări: 1

MD 3944 C2 2009.07.31

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la o tulpină de fungi microscopici din genul *Penicillium*, care poate fi utilizată în industria microbiologică și în scopul protecției mediului ambiant pentru descompunerea xenobioticelor.

5 Sunt cunoscute tulpini de microorganisme, care posedă capacitatea de a descompune atrazina (grupul *s*-triazinelor), benzotiazolul și 2-hidroxibenzotiazolul (grupul benzotiazolilor) [1].

Neajunsul acestor tulpini constă în incapacitatea lor de a degrada compuși chimici din ambele grupuri: *s*-triazine și benzotiazoli.

10 Se mai cunoaște tulpina *Penicillium verrucosum* Dierckx var. *cyclopium* CNM-FP-02 – destructoare a xenobioticelor de grupuri chimice diverse: metalaxil, benzotiazol și 2-hidroxibenzotiazol [2].

Dezavantajul acestei tulpini constă în incapacitatea ei de a descompune atrazina și descompunerea insuficientă a benzotiazolului și 2-hidroxibenzotiazolului.

15 Problema, pe care o rezolvă prezenta invenție, constă în selectarea unei noi tulpini de fungi microscopici, care ar asigura descompunerea concomitentă a atrazinei (grupul *s*-triazinelor) și benzotiazolului, 2-hidroxibenzotiazolului (grupul benzotiazolilor).

Se propune o tulpină de fungi microscopici *Penicillium corylophilum* CNMN - FP - 04 - destructoare a atrazinei și benzotiazolilor.

20 Rezultatul invenției constă în selectarea tulpinii de fungi microscopici *Penicillium corylophilum* Dierckx CNMN-FP-04, care ar asigura descompunerea concomitentă a atrazinei (grupul *s*-triazinelor) și benzotiazolului, 2-hidroxibenzotiazolului (grupul benzotiazolilor).

Rezultatul obținut se datorează particularităților biochimice ale tulpinii, în special spectrului larg de enzime din clasa oxidoreductazelor, pe care le posedă acești fungi microscopici.

Tulpina propusă a fost izolată în cultură axenică din sol cernoziomic carbonatat, recoltat de pe parcele din zona Centrală a Republicii Moldova, prelucrate în repetate rânduri cu preparate pesticide.

25 Caracteristica morfo-culturală a tulpinii.

Pe mediul agarizat Czapek coloniile cresc relativ ușor, atingând în 10...12 zile circa 3 cm în diametru; partea bazală a coloniilor este densă, de 200...350 μm adâncime. Coloniile sunt compacte, cu vârsta ridate și catifelate datorită formării structurilor conidiale abundente. Coloniile tinere au o culoare albastră-verzuie, cu timpul verde-ca-pelinul sau albăstrui-cenușie până la nuanțe cafeniu-măslinii. Exsudație limitată, incoloră. Partea inversă a coloniilor este cafeniu-roșietică, opacă. Conidioforii se formează în zonele marginale ale substratului, în special sub formă de penele ce pornesc de la partea bazală a miceliului, 50...100 x 2,2...2,5 μm, fără ramuri, cu pereți netezi. Penelele sunt variate ca formă, tipic biverticilate și asimetrice, rareori de o structură monoverticilară. Penelele tipice sunt alcătuite din 2...3 metule cu dimensiunile 12...20 x 2...3 μm cu 4...8 sterigme 8...12 x 2...2,5 μm, unele celule sunt mai lungi. Condițiile sferice sau elipsoide, de mărimea 2,5...3,0 μm, cele elipsoide pot atinge 3...3,2 x 2,5...2,8 μm, sunt netede și formează lanțuri dense.

Caracteristica fiziologo-biochimică a tulpinii.

Tulpina crește bine pe mediile obișnuite, inclusiv pe cel mineral. Tipul catabolismului – respirație, aerob, temperatura optimă pentru cultivare -28°C, pH-ul mediului 5,5...5,6.

40 *Exemplu de realizare a invenției*

Tulpinile *Penicillium corylophilum* Dierckx CNMN-FP-04 și *Penicillium verrucosum* Dierckx var. *cyclopium* CNM-FP-02 se cultivă în eprubete pe bragă agarizată timp de 7 zile. Culturile mature se inoculează în baloane conice cu volumul de 250 mL, conținând 50 mL de mediu E-8. Compoziția mediului E-8 fără azot, g/L: KH₂PO₄ – 0,7; MgSO₄ x 7H₂O – 0,8; NaCl – 0,5; apă distilată – până la 1 L; pH-ul inițial 5,5...5,7. Concentrația substanței active a xenobioticelor, care asigură creșterea culturilor, constituie 50 mg/L pentru atrazină și benzotiazol și 100 mg/L pentru 2-hidroxibenzotiazol. Cultivarea are loc pe agitator (180 rot./min) la 28°C. Peste 14 zile sunt determinate cantitățile remanente: ale atrazinei – prin metoda cromatografiei în strat subțire, ale benzotiazolului și 2-hidroxibenzotiazolului – prin metoda HPLC. Drept martor servește compusul organic respectiv în mediu steril E-8.

50 Rezultatele cercetărilor, exemplificate în tabel, atestă că tulpina *Penicillium verrucosum* Dierckx var. *cyclopium* CNM-FP-02 nu posedă capacitatea de a descompune atrazina și are o capacitate medie de descompunere a benzotiazolului și 2-hidroxibenzotiazolului.

Astfel, tulpina de fungi microscopici *Penicillium corylophilum* Dierckx CNMN-FP-04 descompune 69,5% de atrazină în 14 zile cu formarea a trei metaboliți stabili, din care unul este identificat de noi ca 2-clor-4-amino-6-izopropilamino-*s*-triazină, obținut în urma N-dealchilării unei catene laterale a atrazinei, ceea ce atestă pierderea activității *s*-triazinei. Descompunerea benzotiazolului și 2-hidroxibenzotiazolului constituie 71,0 și 72,0%, respectiv și decurge cu formarea a 2...3 metaboliți.

60

Conținutul xenobioticelor la cultivarea în prezența fungilor microscopici,
% din masa introdusă

MD 3944 C2 2009.07.31

4

Varianta	Cantitatea xenobioticelor peste 14 zile, %					
	Atrazină		Benzotiazol (BT)		2-hidroxibenzotiazol (OBT)	
	% de descom-punere	numărul de metaboliți	% de descom-punere	numărul de metaboliți	% de descom-punere	numărul de metaboliți
Martor (mediu steril)	0	-	0	-	0	-
Mediu steril + <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. cyclopium CNM-FP-02 (cea mai apropiată soluție)	0	-	63,0	2	53,0	1
Mediu steril + <i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx CNMN-FP-04 (tulpina propusă)	69,5	3	71,0	3	72,0	2

5 Tulpina de funghi microscopici *Penicillium corylophilum* Dierckx CNMN-FP-04 descompune activ xenobioticele atrazina, benzotiazolul, 2-hidroxibenzotiazolul și poate fi valorificată în protecția mediului înconjurător de poluarea cu acești compuși sintetici.

(57) Revendicări:

10 Tulpină de funghi microscopici *Penicillium corylophilum* CNMN - FP - 04 - destructoare a atrazinei și benzotiazolilor.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Kaufman D.D. and Kearny P.C. Microbial degradation of s-triazine herbicides. Residue reviews, 1970, v. 32, p. 235-265
2. MD 3487 G2 2008.01.31

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

CANȚER Svetlana