



MD 3657 F1 2008.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3657** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/14* (2006.01)
C12R 1/80 (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 2007 0344 (22) Data depozit: 2007.12.25	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.07.31, BOPI 7/2008
(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ, MD (72) Inventatori: COREȚCHI Liuba, MD; BAHNAREL Ion, MD; FRUNZE Nina, MD; COREȚCHI Liliana, MD; SPINU Constantin, MD (73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ, MD	

(54) Tulpină de fungi *Penicillium viride* 2 pentru solubilizarea compușilor
insolubili ai cobaltului

(57) Rezumat:

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

Esența invenției constă în aceea că se propune
o tulpină de fungi *Penicillium viride* 2, depozitată
în Colecția Națională de Microorganisme

2
5 Nematogene cu numărul CNMN-FD-09 pentru
solubilizarea compușilor insolubili ai cobaltului.
Revendicări: 1

10

MD 3657 F1 2008.07.31

MD 3657 F1 2008.07.31

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la o tulpină de fungi, utilizată la solubilizarea fosfatului de cobalt.

5 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 prin utilizarea tulpinii *Mucor vulgaris* X Mich., depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene cu numărul CNMN-FD-07 [2].

10 Neajunsul procedurii constă în aceea că solubilizarea fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Mucor vulgaris* X este mai puțin efektivă, 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.

15 Esența invenției constă în aceea că se propune o tulpină de fungi *Penicillium viride* 2, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene 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.

20 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.

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-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 s-a efectuat conform metodelor cunoscute (Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Наука, 1967, с. 301).

Testarea izolatelor.

35 Tulpinile fungice 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.

45 S-a efectuat testarea unui 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 diametrului de extindere a zonei de solubilizare peste 24, 48, 72, 94 etc. ore de cultivare pe mediul must-agar (marmor), 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.

50 *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 incubază la t=25...26°C. Începând cu a doua zi se înregistrează diametrul coloniei tulpinii *Penicillium viride* 2 și diametrul zonei de solubilizare. Ca marmor 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

MD 3657 F1 2008.07.31

4

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

5 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 $t=25...26^{\circ}\text{C}$. 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

10 diametrul coloniei de solubilizare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Penicillium viride 2* a constituit $90,0\pm 0$ 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.

15

Tabelul

Influența unor microorganisme asupra solubilizării fosfatului de cobalt

Nr. d/r	Tulpina	Varianta, concentrația	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%	$63,75\pm 6,25$	
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,5%	$77,5\pm 18,75$	
2.	<i>Penicillium viride 2</i>	Martor, mediu must-agar	-	
		Musta-agar + fosfat de cobalt 1,0%	$90,0\pm 0^*$	141,2
		Musta-agar + fosfat de cobalt 1,5%	$90,0\pm 0^*$	116,1

20

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

MD 3657 F1 2008.07.31

5

(57) Revendicări:

Tulpină de fungi *Penicillium viride* 2 CNMN-FD-09 pentru solubilizarea compușilor insolubili ai cobaltului.

5

10

(56) Referințe bibliografice:

1. 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
2. MD 3212 G2 2007.08.31

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2007 0344	(85) Data fazei naționale PCT:	
(22) Data depozit: 2007.12.25	(86) Cerere internațională PCT:	
<p>(51) : Int.Cl: <i>C12N 1/14</i> (2006.01) <i>C12R 1/80</i> (2006.01) <i>C01G 51/00</i> (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul : Tulpina de fungi <i>Penicillium viride</i> 2 CNMN-FD-09 pentru solubilizarea compusilor insolubili al elementelor radioactive. (71) Solicitantul : CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ, MD Termeni caracteristici : fungi, compuși de cobalt</p>		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
Int.Cl: <i>C12N 1/14</i> (2006.01), <i>C12R 1/80</i> (2006.01), <i>C01G 51/00</i> (2006.01), <i>C01G 57/00</i> (2006.01) MD 1994-2007 – baza de date EA 1995-2007 – eapatis (www.eapo.org) SU 1970-1991 – certificate de autor		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	1. 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. <i>Micological Research</i> , 1995, 99 (8), p. 987-993	1
A	2. MD 3212 G2 2007.08.31	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării	2008-05-20	
Examinatorul	IUSTIN Viorel	