



MD 4486 B1 2017.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4486** (13) **B1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12R 1/845* (2006.01)  
*C01G 51/00* (2006.01)  
*C01G 53/00* (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<b>In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului</b>	
(21) Nr. depozit: a 2016 0093 (22) Data depozit: 2016.01.21  (67) Numărul cererii transformate și data transformării: s 2016 0004; 2016.08.18	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.05.31, BOPI nr. 5/2017
(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: COREȚCHI Liuba, MD; PLĂVAN Irina, MD; BAHNAREL Ion, MD (73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Tulpină de fungi *Rhizopus stolonifer* pentru biodegradarea compușilor cobaltului și nichelului

(57) Rezumat:

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

Se propune tulpina de fungi *Rhizopus stolonifer*, depozitată în Colecția Națională de

2  
Microorganismе Neputogene cu numărul CNMN-FD-18, pentru biodegradarea unor compuși ai cobaltului și nichelului.

Revendicări: 2

MD 4486 B1 2017.05.31

**(54) Strain of *Rhizopus stolonifer* fungi for biodegradation of cobalt and nickel compounds**

**(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biotechnology and environmental protection, in particular to a fungi strain.

A strain of *Rhizopus stolonifer* fungi, deposited in the National Collection of

2  
Nonpathogenic Microorganisms under the number CNMN-FD-18, is proposed for biodegradation of cobalt and nickel compounds.

Claims: 2

**(54) Штамм грибов *Rhizopus stolonifer* для биодegradации соединений кобальта и никеля**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биотехнологии и охране окружающей среды, а именно к штамму грибов.

Предлагается штамм грибов *Rhizopus stolonifer*, депонированный в Национальной

2  
коллекции непатогенных микроорганизмов под номером CNMN-FD-18, для биодegradации соединений кобальта и никеля.

П. формулы: 2

**Descriere:**

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

5 Este cunoscută utilizarea tulpinilor din genul *Rhizopus*, inclusiv specia *Rhizopus stolonifer*, pentru producerea diferitor tipuri de proteaze [1].

Este cunoscută utilizarea tulpinilor *Aspergillus niger* [2] și *Mucor vulgaris X* [3] în solubilizarea compușilor insolubili, inclusiv a fosfatului de cobalt.

10 Însă solubilizarea fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Aspergillus niger* și *Mucor vulgaris X* este mai puțin efektivă, fiind exprimată prin diametrul mic al zonei de solubilizare în condiții de laborator.

Problema invenției constă în sporirea eficienței biodegradării compușilor cobaltului și nichelului din sol.

15 Invenția soluționează problema prin aceea că se propune tulpina de fungi *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 pentru biodegradarea compușilor cobaltului și nichelului, și anume a fosfatului de cobalt și azotatului de nichel.

20 Tulpina *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 sintetizează enzime proteolitice extracelulare, acizi organici, care contribuie la biodegradarea compușilor metalelor grele, de exemplu a fosfatului de cobalt și azotatului de nichel cu transformarea lor în hidroxizi, oxizi sau alți compuși cu o solubilizare joasă, exprimată prin formarea zonei de solubilizare în jurul coloniei tulpinii în condiții de laborator și stabilită prin schimbarea culorii mediului, în cazul fosfatului de cobalt din culoare roz în incolor, iar în cazul azotatului de nichel – din albă în transparent.

25 Biodegradarea fosfatului de cobalt și a azotatului de nichel are loc sub acțiunea acizilor organici produși de către tulpina *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 cu reprecipitarea ulterioară sub formă de oxalați [Gadd G.M., 1996, 2010], care prezintă compuși organici și sunt biodegradați în continuare de către microorganismele asociate, răspândite în zonele contaminate.

30 Izolarea tulpinii de fungi s-a efectuat din solurile Republicii Moldova. În vederea izolării fungilor din sol la 1 g de sol s-a 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 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. Identificarea microorganismelor agentului s-a efectuat conform metodelor descrise în sursele: Литвинов М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Ленинград, Наука, 1967, 301 с., Микроорганизмы – возбудители болезней растений. Справочник под редакцией чл. кор. АН УССР, В. И. Билай, Н. М. Пидопличко. Грибы - паразиты культурных растений. Определитель. Том 2.

Testarea izolatelor

Tulpinile fungice au fost crescute în 10 cm<sup>3</sup> de mediu must-agar, ingredientele fiind luate în următorul raport pentru 1 L:

must de bere – 250 ml

45 apă distilată – 750 ml

agar-agar – 20 g,

suplimentat cu fosfat de cobalt și azotat de nichel cu concentrația de 0,5...1,5% în cutii Petri. Inocularea s-a efectuat cu discuri de miceliu cu diametrul de 7 mm, tăiate din coloniile crescute pe mediu must-agar la 25°C timp de 2...3 zile. Pentru fiecare variantă s-au efectuat trei și mai multe repetări. Cutiile *Petri* au fost incubate la 25°C.

S-a măsurat diametrul dezvoltării coloniei ciupercii și diametrul zonei de biodegradare din jurul coloniei.

55 S-a efectuat testarea unui set (n=32) 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 biodegradare peste 24, 48, 72 și 94 ore de cultivare pe mediu must-agar (martor) suplimentat cu fosfat de cobalt și azotat de nichel în concentrație de 0,5...1,5%.

## Exemplul 1

Tulpina *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 a fost crescută în cutii Petri pe mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi colonii mici cu diametrul de 7,0 mm s-au inoculat pe mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt și azotat de nichel în concentrație de 0,5% și s-au incubat la 25...26°C.

Incepand cu a doua zi s-a înregistrat diametrul coloniei tulpinii *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 și diametrul zonei de biodegradare. Ca martor a servit inocularea cu tulpina *Aspergillus niger* și *Mucor vulgaris* X. S-a observat că diametrul zonei de biodegradare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 este de  $100,0 \pm 0$  mm, fiind cu 20,0 mm mai mare decât în cazul acțiunii tulpinii *Aspergillus niger*, ceea ce constituie 125,0%. Eficiența față de *Mucor vulgaris* constituie 111,1%.

## Exemplul 2

Tulpina *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 a fost crescută în cutii Petri pe mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi colonii mici cu diametrul de 7 mm s-au inoculat pe mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt în concentrație de 1,0% și s-au incubat la temperatura de 25...26°C. Incepand cu a doua zi s-a înregistrat diametrul coloniei tulpinii și diametrul zonei de biodegradare. Ca martor a servit inocularea cu tulpina *Aspergillus niger* și *Mucor vulgaris* X. S-a observat că diametrul zonei de biodegradare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 este de  $100,0 \pm 0$  mm, fiind cu 56,0 mm mai mare decât în cazul tulpinii *Aspergillus niger*, ceea ce constituie 227,3%. Eficiența față de *Mucor vulgaris* X constituie 156,9%.

## Exemplul 3

Tulpina *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 a fost crescută în cutii Petri pe mediu must-agar timp de 5 zile. Apoi colonii mici cu diametrul de 7 mm s-au inoculat pe mediul must-agar suplimentat cu fosfat de cobalt în concentrație de 1,0% și s-au incubat la temperatura de 25...26°C. Incepand cu a doua zi s-a înregistrat diametrul coloniei tulpinii și diametrul zonei de biodegradare. Ca martor a servit inocularea cu tulpina *Aspergillus niger* și *Mucor vulgaris* X. S-a observat că diametrul zonei de biodegradare a fosfatului de cobalt sub acțiunea tulpinii *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 este de  $100,0 \pm 0$  mm, fiind cu 37,0 mm mai mare decât în cazul tulpinii *Aspergillus niger*, ceea ce constituie 158,7%. Eficiența față de *Mucor vulgaris* X a constituie 129,0%. Datele privind eficiența tulpinii propuse sunt expuse în tabelul 1, unde sunt prezentate datele comparative ale activității tulpinii *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18, *Mucor vulgaris* X și *Aspergillus niger* referitor la biodegradarea fosfatului de cobalt.

Metodologia expusă mai sus a fost similară cu cea utilizată pentru cercetarea interacțiunii tulpinii *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 cu azotatul de nichel (tabelul 2). Eficiența față de *Aspergillus niger* a constituit 119,8%; 181,81% și 125,4%, respectiv pentru concentrațiile de 0,5%, 1,0% și 1,5%.

Tabelul 1

Influența tulpinilor de fungi asupra fosfatului de cobalt

N d/r	Tulpina	Variantă, concentrație	Diametrul zonei de biodegradare a fosfatului de cobalt, mm	Eficiența față de <i>Aspergillus niger</i> , %	Eficiența față de <i>Mucor vulgaris</i> X, %
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</i>	Martor, mediu must- agar	-		

# MD 4486 B1 2017.05.31

5

	<i>vulgaris X</i>	Must-agar + fosfat de cobalt 0,5%	90,0 ± 0		
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,0%	63,75 ± 6,25		
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,5 %	77,5 ± 18,75		
3.	<i>Rhizopus stolonifer</i> CNMN-FD-18	Martor, mediu must- agar	-		
		Must-agar + fosfat de cobalt 0,5%	100,0 ± 0 <sup>x</sup>	125,0	111,1
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,0 %	100,0 ± 0 <sup>x</sup>	227,3	156,9
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,5%	100,0 ± 0 <sup>x</sup>	158,7	129,0

Notă: x - diferența dintre diametrul zonei de biodegradare a fosfatului de cobalt de către tulpina *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 față de *Aspergillus niger* și *Mucor vulgaris X* este autentică pentru P<0,5.

5

Tabelul 2

Influența unor tulpini de fungi asupra biodegradării azotatului de nichel

N d/r	Tulpină	Variantă, concentrație	Diametrul zonei de biodegradare a azotatului de nichel, mm	Eficiența față de <i>Aspergillus niger</i> , %
1	<i>Aspergillus niger</i>	Martor, mediu must-agar	-	
		Must-agar + fosfat de cobalt 0,5%	80,0±0	
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,0%	44,0±6,5	
		Must-agar + fosfat de cobalt 1,5%	63,0±7,2	
2	<i>Rhizopus stolonifer</i> CNMN-FD-18	Martor, mediu must-agar	-	
		Must-agar + azotat de nichel 0,5%	95,85±2,02 <sup>x</sup>	119,8
		Must-agar + azotat de nichel 1,0%	80,0±0,87 <sup>x</sup>	181,81
		Must-agar + azotat de nichel 1,5%	79,0±0,92 <sup>x</sup>	125,4

10

Notă: x - diferența dintre diametrul zonei de biodegradare a azotatului de nichel de către tulpina *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 față de *Aspergillus niger* este autentică pentru P<0,5.

**(56) Referințe bibliografice citate in descriere:**

1. Kranthi V. S., Mulralidhar R. D., Aganmohan P. J. Protease production by *Rhizopus stolonifer* thru solid state fermentation. Central European Journal of Experimental Biology, 2012, 1 (3):113-117
2. Sayer J.A., Raggett S.L., Gadd G. M. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilization ability and metal tolerance. Microbiological Research, 99, p 987-993
3. MD 3212 F1 2006.12.31

**(57) Revendicări:**

1. Tulpină de fungi *Rhizopus stolonifer* CNMN-FD-18 pentru biodegradarea compușilor cobaltului și nichelului.
2. Tulpină, conform revendicării 1, în care compușii sunt fosfatul de cobalt și azotatul de nichel.

**Șef adjunct Direcție Brevete :**

GUȘAN Ala

**Examinator:**

COLESNIC Inesa

**Redactor:**

LOZOVANU Maria

