



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00001

(22) Data de depozit: 03.01.2012

(41) Data publicării cererii:  
30.07.2012 BOPI nr. 7/2012

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA "LUCIAN BLAGA" DIN  
SIBIU, BD.VICTORIEI NR.10, SIBIU, SB, RO

(72) Inventatori:  
• MIRONESCU MONICA, STR. 9 MAI NR.65,  
BL.77, SC.A, AP.5, SIBIU, SB, RO;

• MIRONESCU ION DAN, STR. 9 MAI  
BL. 77, SC. A, ET. 3, AP. 5, SIBIU, SB, RO;  
• OPREAN LETIȚIA, STR. FLORILOR  
NR. 16, SIBIU, SB, RO;  
• GEORGESCU CECILIA,  
STR. AVRAM IANCU NR.5, SELIMBAR, SB,  
RO;  
• ȚIȚU AUREL MIHAIL, STR. LUPTEI  
NR. 13, BL. C, SC. A, AP. 2, SIBIU, SB, RO

(54) BIOFILM POLIZAHARIDIC CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un biofilm polizaharidic cu acțiune antimicrobiană, destinat utilizării în industria alimentară. Procedul de obținere a biofilmului se realizează în condiții controlate de pH, temperatură, folosind un mediu specific, permițând obținerea cu randament mare a unui polizaharid extracelular. Produsul conform invenției este constituit dintr-un polizaharid extracelular sintetizat de arheea extrem halofilă *Haloferox mediterranei*, obținut în urma cultivării microorganismului pe mediu cu conținut ridicat de NaCl.

Revendicări: 3  
Figuri: 4

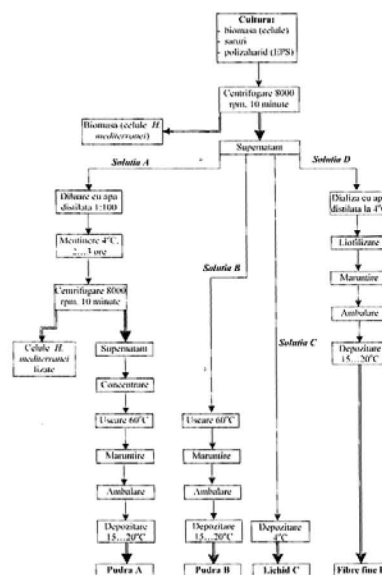


Fig. 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



15

BREVET DE INVENȚII ȘI MĂRCI	
Nr.	0 2012 0000 1
Data depozit	03-01-2012

### Descrierea invenției

1) Descrierea invenției, conform prevederilor art. 14 alin. (1) lit.c) din lege, va conține următoarele:

a) titlul invenției, așa cum acesta a fost indicat în cererea de brevet de invenție, într-o formulare clară și concisă a invenției revendicate, fără să o divulge și fără a conține denumiri fanteziste:

#### **Biofilm polizaharidic cu acțiune antimicrobiană**

b) precizarea domeniului tehnic la care se referă invenția:

#### **Industria alimentară**

c) prezentarea stadiului tehnicii, considerat de solicitant a fi necesar pentru înțelegerea, cercetarea documentară și examinarea cererii de brevet, cu indicarea documentelor care îl fundamentează: se prezintă cel puțin o soluție considerată cea mai apropiată de invenția revendicată; în situația în care stadiul tehnicii cuprinde și cunoștințe tradiționale: acestea vor fi indicate explicit în descriere, inclusiv sursa acestora, dacă este cunoscută:

Din cele mai vechi timpuri oamenii au elaborat metode pentru conservarea alimentelor prin inhibarea dezvoltării microorganismelor patogene. Principala zonă de contaminare a alimentelor este suprafața. Pentru a controla apariția și dezvoltarea superficială a microorganismelor nedorite în procesele de manipulare, transport, depozitare, se pot folosi substanțe antimicrobiene înglobate în materialul ambalajului sau în filme de acoperire. Aceasta duce la creșterea duratei de păstrare și îmbunătățește siguranța alimentelor.

Au fost testați o serie de compuși privind acțiunea antimicrobiană în straturile superficiale. Dintre aceștia mai des utilizați sunt:

- agenți antimicrobieni folosiți de obicei în produsele alimentare: sorbați, acid p-aminobenzoic în biofilme de celuloză sau proteine;
- surfactanți anionici conținând grupări alchil sulfonat sau sulfat sau acizi: malic, citric utilizați ca agenți antimicrobieni în caserolele absorbante pentru carnea proaspătă sau refrigerată (Cha and Channan, 2004);
- materiale care în contact cu apa sau vaporii de apă emit radiații infraroșii, eficiente împotriva microorganismelor, fără riscuri asociate cu radiațiile cu energie mare (Brody, 2001);
- bacteriocine: substanțe de natură proteică cu efect antimicrobian produse de anumite microorganisme, care sunt acceptate la utilizarea în alimente - de exemplu nisina (Hoover and Stevenson, 1993).

Tendința actuală legată de alegerea agenților antimicrobieni este spre utilizarea materialelor biologice care au acțiune antimicrobiană superficială, fără să fie necesară

migrarea componentului antimicrobian din ambalaj în produs pentru ca acesta să fie eficient, precum filmele biopolimerice. Se pot defini trei categorii de biopolimeri:

- biopolimeri extrasi direct din surse vegetale: amidon, celuloza, proteine;
- biopolimeri produși sintetic din monomeri naturali;
- biopolimeri produși de microorganisme: polizaharide, polihidroxibutirat.

O tendință actuală este de folosire a biopolimerilor de origine microbiană ca agenți antimicrobieni.

Bacteriile secreta în mediul exterior exopolizaharide organizate sub formă de capsule sau mucus. Rolul exo-polizaharidelor este complex și anume pot avea rol structural (în membrana celulară) sau de a se atașa la suprafețe, contribuie la îmbunătățirea preluării de nutrienți, la protecția bacteriilor față de diferiți factori din mediu, acționează ca molecule de semnalizare în sistemul de reglare homeostatic (Iqbal et al., 2002) (Wingender et al., 1999).

Polizaharidele nu sunt toxice. Pot avea o permeabilitate selectivă la dioxid de carbon, oxigen și prin aceasta pot influența respirația produselor în cazul când sunt utilizate ca biofilme de protecție. Constituie o slabă barieră de vapori, astfel ca vaporii formați în produs vor fi eliminați fără să condenseze la interfața produs-biofilm și să activeze dezvoltarea de microorganisme (Park et al., 1994).

La ora actuală alginatii se utilizează ca biofilme de acoperire pe diferite produse alimentare. Alginatii sunt obținuți din alge sau sunt secretați de bacterii. Filmul de alginat se bazează pe formarea gelurilor cu ioni di- și trivalenți; mai frecvent se utilizează ioni de calciu (Braecini and Perez, 2001). Multe studii prezintă rezultatele pozitive obținute prin folosirea filmelor de alginat pentru produsele din pește, carcăse de miel, carne de vită transată și pui referitor la menținerea caracteristicilor senzoriale, prevenirea contaminării cu microorganisme și a pierderii de suc.

În ultima vreme se manifestă un interes crescut pentru microorganisme ce se dezvoltă în condiții extreme. Acest interes este justificat de caracteristicile unice la nivel genetic, biochimic, fiziologic și evolutiv al acestora (Oren, 2002a). Pe lângă acestea, ele deschid multe perspective biotehnologiilor. Unul dintre aceste microorganisme, care se dezvoltă în medii puternic salinice este *Haloflex mediteranei*.

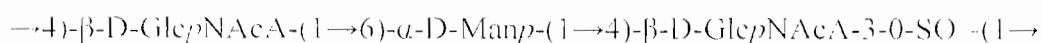
*Haloflex mediteranei* este o archebacterie extrem halofilă aparținând familiei Halobacteriaceae, ordinul Halo-bacteriales, domeniul Archaea. Se dezvoltă la concentrații foarte ridicate de sare (18-25%), la pH neutru (7.2-7.4) și la temperaturi între 35-45°C. Necesarul de magneziu este și el ridicat (0,01-0,04M). Microorganismul prezintă un metabolism chemoorganotrofic aerob (Oren, 2002a). Datorită toleranței la sare acest

microorganism poate fi cultivat fara masuri suplimentare de sterilitate, ceea ce poate reduce costurile de cultivare si poate fi atractiv pentru productia industrială (Oren, 2002b).

Principalii metaboliti sintetizati de acest microorganism sunt:

- polihidroxitiratul produs in cantitate mare si care poate fi utilizat ca un material plastic biodegradabil;
- polizaharide rezistente la concentratii mari de sare;
- enzime stabile in conditii extreme de osmolaritate, temperatura, sau solventi organici;
- proteine antimicrobiene denumite halocine (Kis-Papo and, 2000).

Exopolizaharidul produs de *Haloférox mediteranei* (EPS) prezinta un interes deosebit datorita structurii si proprietatilor lui. El contine acizi uronici si esteri sulfat care sunt responsabile de interactiunile zaharuri-proteine si de functii biologice. Ca monomeri, EPS contine hexoze neutre (manoza, galactoza, glucoza) si aminozaharuri (glucozamina si galactozamina). Studiile de structura (Parolis et al., 1996) releva o molecula lineara cu o secventa de trizaharide:



Studiul proprietatilor reologice arata ca solutiile de exopolizaharid au comportament viscos si pseudoplastic ca vizeozitatea creste considerabil cu concentratia si este stabila la modificarea conditiilor de temperatura si salinitate in limite destul de largi (Mironescu and Mironescu, 2011). Studii mai recente scot in evidenta faptul ca EPS pot avea structuri diferite functie de salinitatea mediului (Mizarakhmetova et al., 2001) (Mironescu and Mironescu, 2004). La salinitati mari, ionii de sodiu neutralizeaza grupurile acide si particulele devin sferice. Este posibila in aceste conditii gelificarea si agregarea prin legaturi de hidrogen.

In literatura nu exista referinte privind utilizarea polizaharidului din *Haloférox mediteranei* ca biofilm antimicrobian, dar compozitia, structura si proprietatile sunt argumente pentru utilizarea sa in structura biofilmelor antimicrobiene.

di prezentarea problemei tehnice pe care solicitantul și-a propus să o rezolve invenția: problema tehnică constă în formularea obiectivului prin a cărui soluționare se obține un succes în domeniul tehnic la care se referă invenția:

Alimentele proaspete pot contine microorganisme contaminante atat la suprafata cat si in interior. Daca aceste microorganisme nu sunt distruse, ele constituie un pericol pentru sanatatea umana. In mare pericol de contaminare sunt produsele de origine animala care isi pierd imunitatea in procesul de prelucrare. La produsele de carne si peste, mai ales daca animalul a fost sanatos, contaminarea superficiala este principala sursa de microorganisme.

Aplicarea biofilmelor antimicrobiene este o soluție pentru evitarea acestui aspect. Studiul microorganismului ce se dezvoltă în condiții extreme, arheea extrem halofila *Haloferax mediterranei*, a scos în evidență faptul că produce un polizaharid a cărui structură și proprietăți ne permit să considerăm că poate fi folosit ca biofilm antimicrobian.

Brevetul are ca obiectiv obținerea unui biofilm pe baza de polizaharid sintetizat extracelular de *H. mediterranei* care să aibă acțiune antimicrobiană și să fie aplicabil pe alimente. Pentru aceasta, se va testa acțiunea antimicrobiană pe microorganisme patogene și comportarea biofilmului pe esanțioane de produse alimentare pentru stabilirea tipurilor de microorganisme sensibile la această acțiune, precum și a modului de tratare a produsului alimentar cu biofilm.

Sarea are acțiune conservantă asupra alimentelor. Se va testa și posibilitatea de folosire a sării care există deja în componenta substratului de cultivare a microorganismului.

e) expunerea invenției, așa cum este revendicată, astfel încât problema tehnică, chiar dacă nu e prezentată explicit, și mijloacele prin care aceasta a fost rezolvată să poată fi înțelese de către o persoană de specialitate în domeniu: în cazul în care descrierea cuprinde un grup de invenții care respectă condiția de unitate a invenției, expunerea fiecărei invenții din grup se efectuează în mod distinct;

Această invenție se referă la folosirea unui biofilm polizaharidic cu acțiune antimicrobiană pe alimente, în scopul conservării lor.

Biofilmul este obținut prin cultivarea arheei *Haloferax mediterranei* pe un substrat foarte bogat în saruri. Se folosește amestecul rezultat, cu și fără celule sau saruri, care este uscat și măcinat. Pudra rezultată poate fi păstrată timp îndelungat. Biofilmul este obținut prin dispersarea în soluție salină sau apă a pudrei în proporție 1:50 până la 1:100. Biofilmul are o structură discontinuă, cu aglomerări de EPS amestecate cu cristale de sare și celule, amestecul fiind dispersat într-o soluție salină. Biofilmul are acțiune de inhibare a creșterii bacteriilor patogene *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* și de stagnare a creșterii bacteriilor din genul *Salmonella*.

Biofilmul se folosește ca atare pe alimentele care sunt conservate în mod obișnuit prin sare, precum peștele. Pentru aplicarea biofilmului, peștele se imersează direct în lichid și se menține un timp scurt. După aceea, peștele se refrigerază (pentru depozitarea de scurtă durată) sau se congelează (pentru depozitarea de durată lungă).

Înainte de folosirea în alimentație, peștele se spală cu apă, pentru îndepărtarea biofilmului (alcatuit din saruri și polizaharid, ambele solubile în apă), astfel ca pe produs nu

mai ramane nimic din biofilmul aplicat. Pestele poate fi consumat ca atare sau prelucrat, pentru obtinerea de diverse alte produse.

f) prezentarea avantajelor invenției în raport cu stadiul tehnicii:

La nivel conceptual, utilizarea acestui biofilm prezinta mai multe avantaje:

- EPS sintetizat de microorganismul extrem halofil *Haloferax mediterranei* este adaptat la concentratii saline foarte ridicate (intre 150 si 250 g/l). Luand in considerare aceasta adaptare, concentratiile mari de sare in biofilm nu vor afecta structura biopolimerului;
- Biofilmul are in compozitia sa cantitati foarte mari de sare, cu actiune de conservare a alimentelor;
- Biofilmul are actiune antimicrobiana contra bacteriilor patogene.

La nivel practic, solutia prezentata este ieftina, deoarece se foloseste NaCl existent deja in mediul de cultura. Biofilmul poate fi construit direct din supernatantul obtinut dupa cultivarea microorganismului. O astfel de solutie reduce cantitatea de deseuri si costurile de productie.

Filmul antimicrobian produs astfel are caracteristici importante: este natural, biodegradabil, se obtine în cantitati controlate si poate fi îndepartat usor de pe produs.

g) prezentarea, pe scurt, a figurilor din desene, dacă acestea există:

Figurile prezinta schematic etapele de lucru.

Prima figura reprezinta schema tehnologica de obtinere a inoculului.

A doua figura reprezinta schema tehnologica de la cultivare a microorganismului.

A treia figura reprezinta schema tehnologica de obtinere a pudrei (sau lichidului, in functie de solutia aplicata) care sta la baza biofilmului.

A patra figura reprezinta schema tehnologica de obtinere, aplicare si îndepartare a biofilmului.

In prezentarea în detaliu a cel puțin unui mod de realizare a invenției revendicate, utilizând exemple acolo unde este cazul și cu referire la desene, dacă acestea există; în cazul unor variante de realizare, se prezintă cel puțin un exemplu de realizare pentru fiecare variantă:

In continuare se dau etapele de realizare a inventiei:

### **Etapa 1: Obținerea inoculului**

Mediu de cultura pentru obtinerea inoculului are urmatoarea compozitie: NaCl 125 g/l; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 g/l; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,133 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,025 g/l; extract de drojdie 5 g/l; peptonă 5 g/l; glucoză 2 g/l. Se ajustează pH-ul la 7,2 cu soluție KOH 4N, se sterilizeaza mediul de cultura la 121°C, 20 minute, se raceste si apoi se adauga o cantitate mica de cultura pura de *Haloflex mediterranei* (DSMZ Germany).

Cultura este crescută (activată) pe mediul de cultura la temperatura de 38°C, cu agitare continua la 500 rpm timp de 72 h pentru obținerea inoculului.

### **Etapa 2: Cultivarea microorganismului**

Cultivarea este condusă în sistem batch. La cultivarea lui *H. mediterranei* trebuie folosita o instalatie care sa indeplineasca următoarele cerinte minimale: constructie rezistenta la coroziune (mediul de cultură are acțiune puternic corozivă); sistem de agitare si aerare; sistem de control și reglare a pH-ului și temperaturii pe tot parcursul cultivării. Pe toata durata cultivării se controleaza pH-ul (7,2...7,5) si temperatura (38°C...43 °C) si se face aerare cu aer sterilizat (1l/minut).

Ca mediu nutritiv se foloseste un mediu natural ce contine: NaCl 200...300 g/l; cloruri 110...150 g/l; magneziu 30...60 mg/l; sodiu 200...400 mg/l; calciu 500...800 mg/l; sulfat 3,5...5 g/l; azot total 1,5...2,5 g/l; reziduul la 105°C 200...300 g/l. Mediul are conductivitatea electrica 200...250 mS/cm si duritatea 95...120°Ge. La initierea cultivării, în vasul de cultivare se aduce cantitatea totala de mediu nutritiv (care se sterilizeaza in prealabil sau direct în vasul de cultivare la 121°C, 20 minute) si apoi inoculul; raportul între inocul si mediul de cultivare este 1:5 pana la 1:10, in functie de cat de activ este inoculul si de cat de mult se doreste sa se faca cultivarea. Pe toata durata cultivării se controleaza pH-ul (7,2...7,5) si temperatura (38°C...43 °C). Cultivarea se considera terminata atunci cand mediul este epuizat in sursa de azot (după 10-15 zile de cultivare).

La sfarsitul cultivării, amestecul ce consta din mediul nutritiv epuizat in nutrienti, celulele de *H. mediterranei* si polizaharidul extracelular (EPS) se scoate din bioreactor. In functie de compozitia exacta a mediului nutritiv, randamentul este de 6...10 g/l EPS si 4...7 g/l celule.

### **Etapa 3: Obtinerea pudrei/lichidului la baza biofilmului**

#### Soluția A

Se indeparteaza partial celulele prin centrifugare (8000 rpm, 10 minute). Supernatantul este diluat cu apa distilata in proportie amestec:apa = 1:100 si se lasa la 4°C timp de 2 ... 3

ore, timp în care celulele ramase sunt lizate (omorate). Se mai face o centrifugare (8000 rpm, 10 minute), iar supernatantul se concentreaza pana se elimina toata apa distilata introdusa. Proba este uscata la 60°C si apoi macinata fin. Se obtine un produs sub forma de pudra care contine fibre fine de EPS amestecate cu cristale mici de sare, care se pastreaza la 15...20°C timp indelungat. Pentru obtinerea biofilmului, produsul este amestecat cu apa in proportie produs:apa = 1:50 pana la 1:100. Se depoziteaza la 4°C inaintea folosirii.

#### Solutia B

In urma indepartarii partiale a celulelor microbiene prin centrifugare (8000 rpm, 10 minute), in lichid raman toate sarurile si EPS. Proba este uscata la 60°C si apoi macinata fin. Se obtine un produs sub forma de pudra care contine fibre fine de EPS amestecate cu cristale mici de sare, care se marunteste si se pastreaza la 15...20°C timp indelungat. Pentru obtinerea biofilmului, produsul este amestecat cu apa în proportie produs:apa = 1:50 pana la 1:100. Se depoziteaza la 4°C inaintea folosirii.

#### Solutia C

In urma indepartarii partiale a celulelor microbiene prin centrifugare (8000 rpm, 10 minute), in lichid raman toate sarurile si EPS. Acesta se foloseste ca atare imediat după separarea celulelor sau se pastreaza la 4°C timp de o saptamana, perioada in care se poate folosi ca biofilm.

#### Solutia D

Lichidul rezultat in urma indepartarii partiale a celulelor microbiene prin centrifugare (8000 rpm, 10 minute) este supus dializei cu apa distilata la 4°C, pana cand conductibilitatea apei de dializa atinge a valoarea foarte apropiata de a apei distilate folosite. Solutia de EPS rezultata este liofilizata. Se obtine un produs sub forma de fibre, care se marunteste si se pastreaza la 15...20°C timp indelungat. Pentru obtinerea biofilmului, produsul este amestecat cu apa in proportie produs:apa = 1:50 pana la 1:100. Se depoziteaza la 4°C inaintea folosirii.

#### **Etapa 4: Obținerea și aplicarea biofilmului**

Biofilmul este aplicat prin imersarea probei (peste eviscerat), urmata de mentinerea probei timp de aproximativ 10 minute in suspensia de biofilm, scurgerea si, eventual, uscarea la 40...60°C. Pestele se pastreaza ca atare protejat de biofilm (dar durata de pastrare este



scurta, de maxim 2 zile), sau se refrigereaza (pentru depozitarea de scurta durata) sau se congeleaza (pentru depozitarea de durata lunga).

#### **Etapa 5: Indepartarea biofilmului**

Inaintea folosirii in alimentatie, pestele se imerseaza in apa potabila in raportul 1:10 pana la 1:15 (v/v), se mentine timp de 10 minute si apoi se spala cu jet de apa potabila timp de 2 minute. Se usuea produsul cu aer cald.

Aceasta tehnica permite indepartarea completa a biofilmului (alcatuit din saruri si polizaharid, ambele solubile in apa), astfel ca pe produs nu mai ramane nimic din biofilmul aplicat. Pestele poate fi consumat ca atare sau prelucrat, pentru obtinerea de diverse alte produse.

## Bibliografie

1. Braccini L., Perez, S., 2001, Molecular basis of  $\text{Ca}^{2+}$  induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited, *Biomacromolecules*, 2, p. 1089-1096
2. Brody A.L., 2001, Antimicrobial packaging, In *Active packaging for food applications*, pp. 131-194, Brody A.L., Strupinsky E.R., and Kline L.R. (Eds.), Chapter 10, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA.
3. Cha D.S., Chinnan M.S., 2004, Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:223-237
4. Hoover D.G., Stevenson L.R., 1993, *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Academia Press, San Diego, CA.
5. Iqbal A., Bhatti H.N., Nosheen S., Jamil A., Malik M.A., 2002, Histochemical and physicochemical study of bacterial exopolysaccharides, *Biotechnology*, 1 (1), p. 28-33
6. Kis-Papo T., Oren A., 2000, Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds?, *Extremophiles*, 4(1), p. 35-41
7. Mironescu M., Mironescu V., Complexant properties of exopolysaccharides from *Haloferax mediterranei*, *Journal of agroalimentary processes and technologies*, 2004, vol. X, no. 1, pag. 289-295, ISSN 1453-1399
8. Mironescu M., Mironescu I.D., 2011, Rheological behaviour of a novel microbial polysaccharide, *Romanian Biotechnological Letters*, 16 (2), 6105-6114
9. Mirzarakhmetova D., Perner L., Posten C., 2001, Gewinnung und Charakterisierung bakterieller Polysaccharide. *Wiss. Abschlussber. 36. Internationales Seminar Univ. Karlsruhe*
10. Oren A., 2002a, Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and applications, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 56-63
11. Oren A., 2002b, Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria, *FFMS Microbiology Ecology*, 39, p. 1-7
12. Park H.J., Chinnan M.S., Shewfelt R.L., 1994, Edible coating effects on storage life and quality of tomatoes, *J. Food Sci.*, 59, p.568-570.
13. Parolis H., Parolis L.A.S., Boán I.F., Rodríguez-Valera F., Widmalm G., Manca M.C., Jansson P.-E., Sutherland I.W., 1996, The structure of the exopolyaccharide produced by the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500), *Carbohydr. Res.*, 295: 147-156
14. Wingender J., Neu R., Flemming H-C., 1999, What are bacterial extracellular polymeric substances?, in *Microbial extracellular polymeric substances*, ed. by Wingender, J., Neu, R., Flemming, H-C. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg

## Revendicări

1. Biotehnologia de cultivare a microorganismului *Haloferax mediterranei* în sistem batch, **caracterizată prin aceea că** se realizează în condiții controlate de pH, temperatură, folosind un mediu specific și permite obținerea cu randament mare a unui polizaharid extracelular (EPS).
2. Biofilm polizaharidic cu acțiune antimicrobiană, **caracterizat prin aceea că** este constituit din polizaharidul extracelular sintetizat de arheea extrem halofilă *Haloferax mediterranei*, obținut în urma cultivării microorganismului pe mediu cu conținut ridicat de NaCl.
3. Tehnica de aplicare și îndepărtare a biofilmului polizaharidic cu acțiune antimicrobiană, **caracterizată prin aceea că** este non-invazivă și permite îndepărtarea completă a biofilmului.

**Etapa 1: Obținerea inoculului**

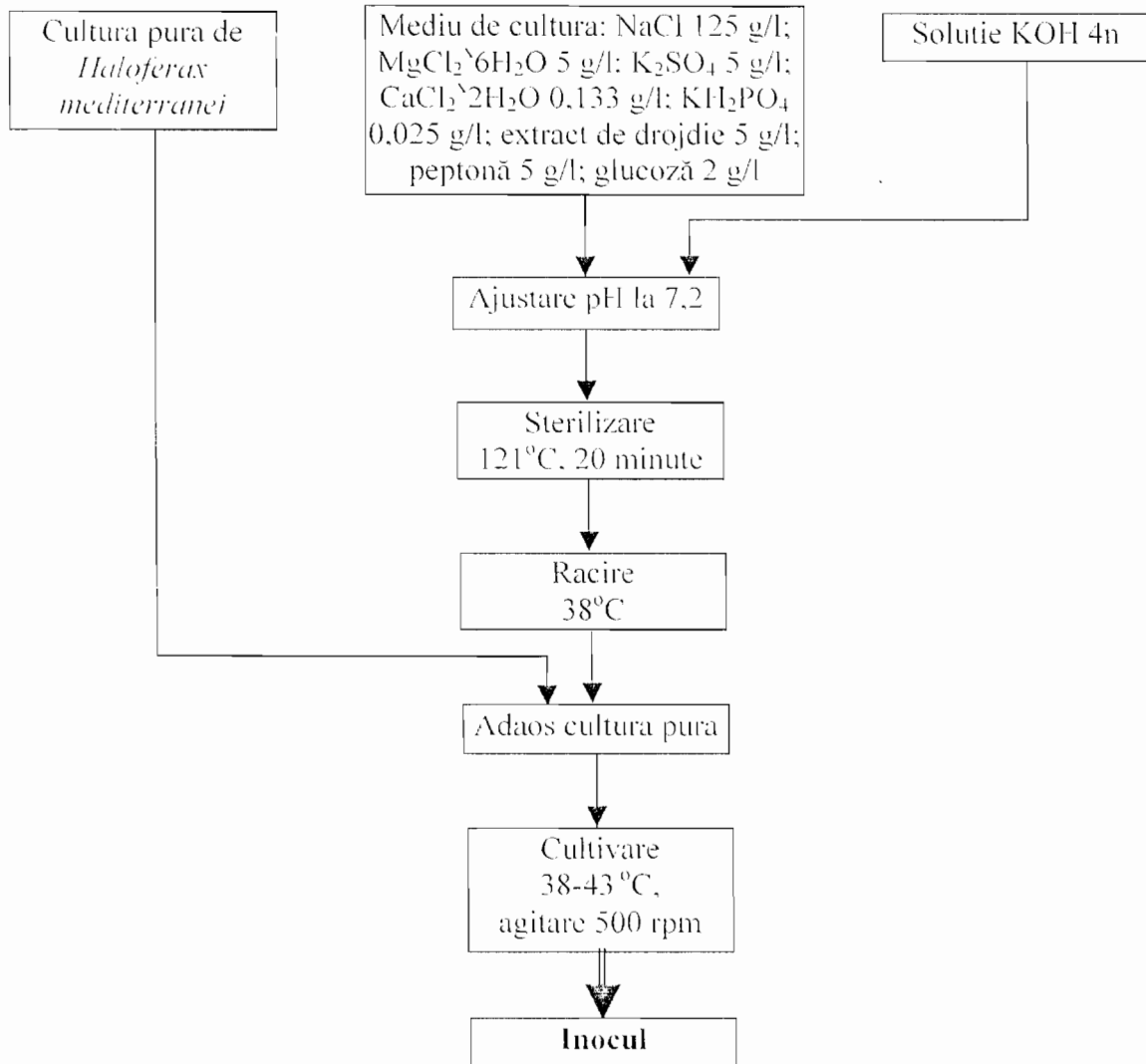
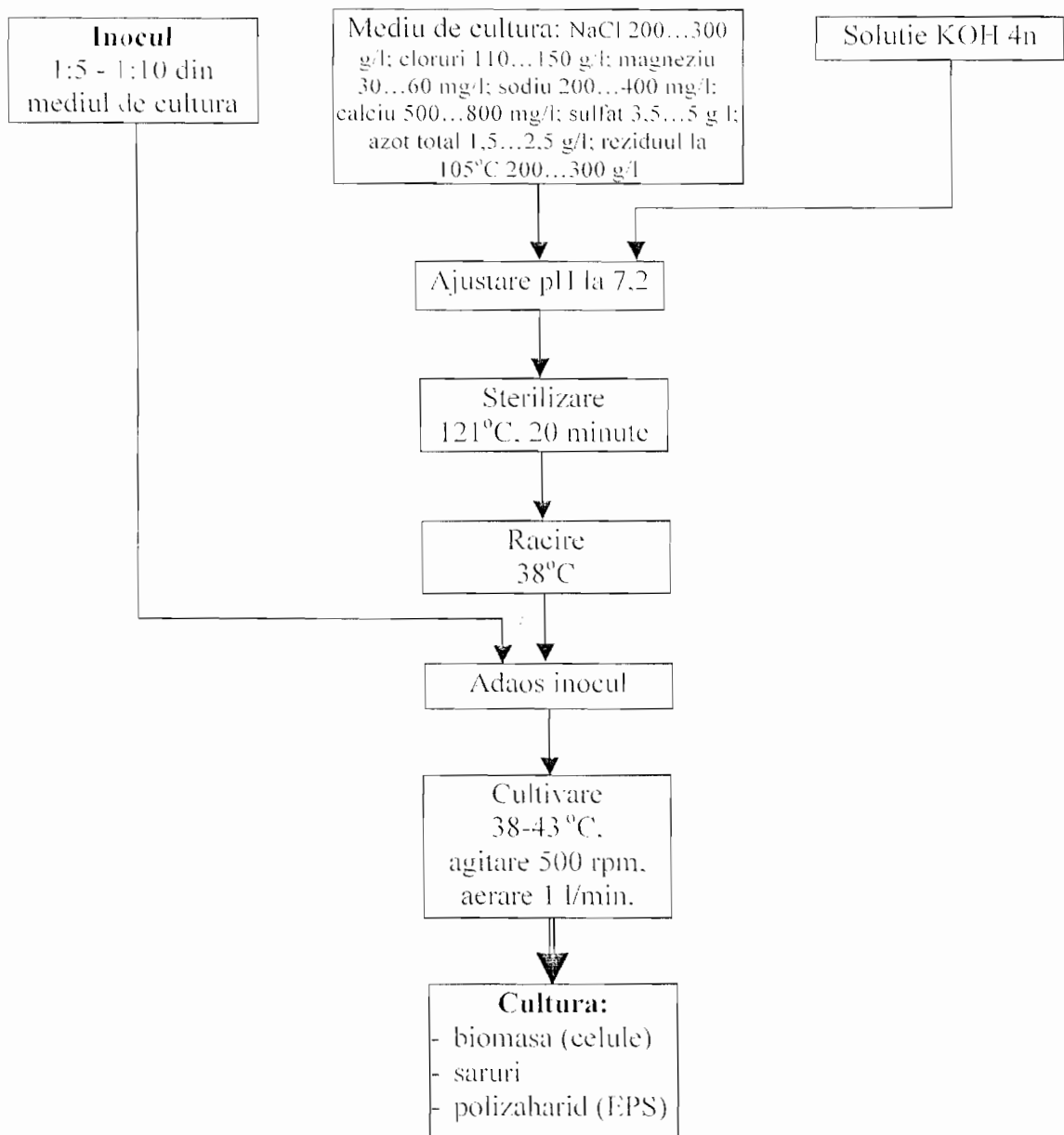


Fig. 1

**Etapa 2: Cultivarea microorganismului**



**Fig. 2**

## Etapa 3: Obținerea pudrei/lichidului la baza biofilmului

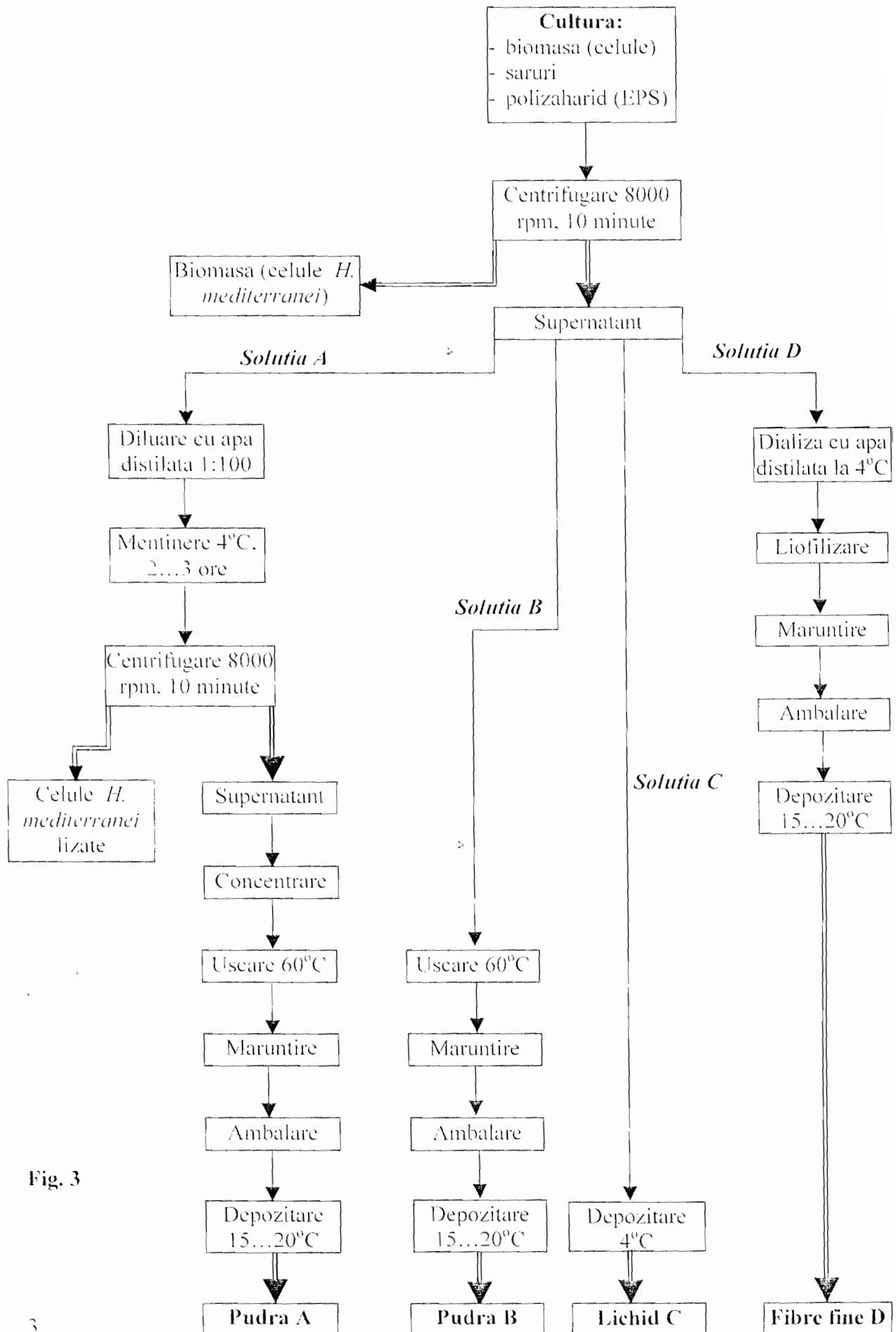


Fig. 3

**Etapele 4 si 5: Obtinerea, aplicarea si indepartarea biofilmului**

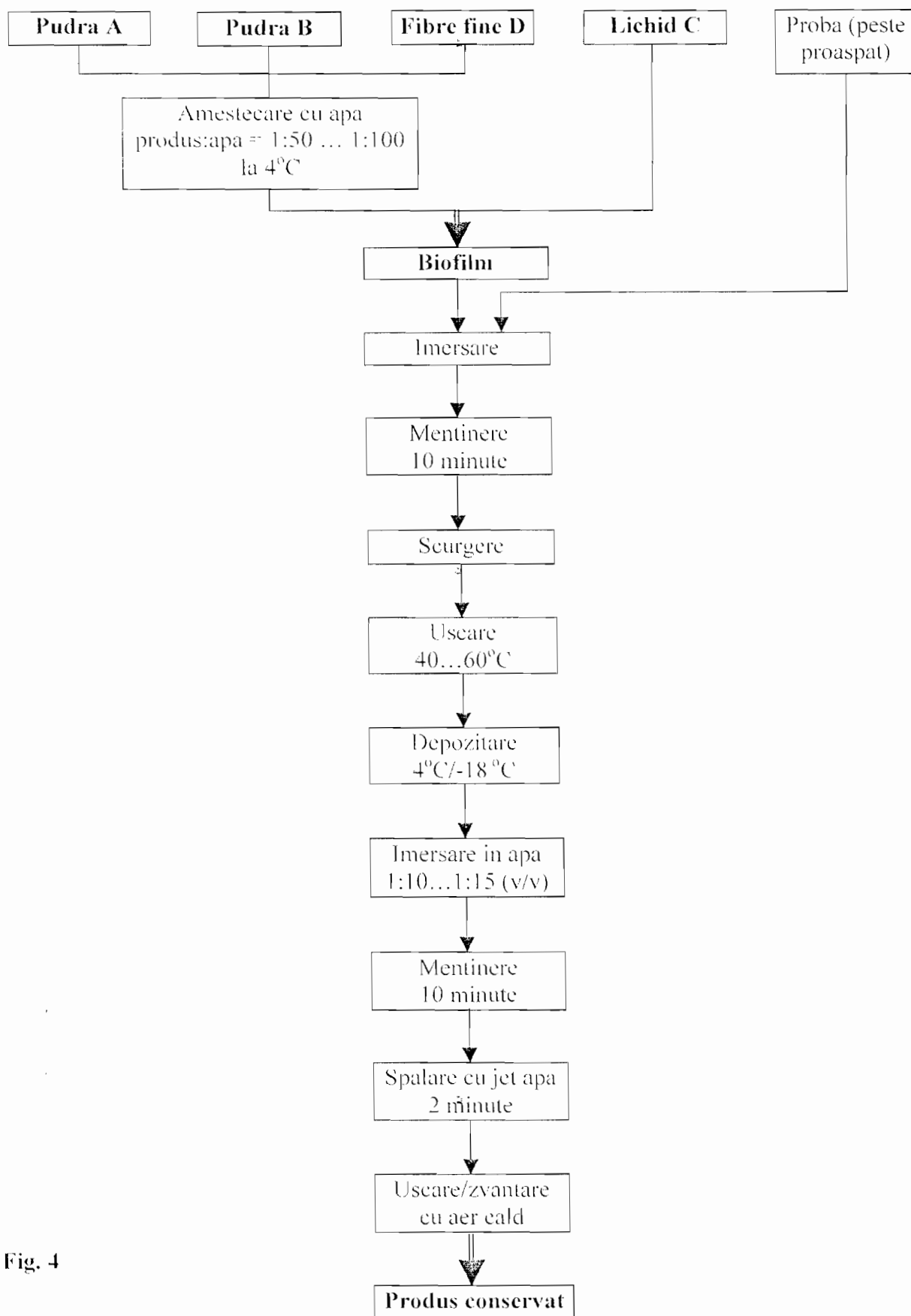


Fig. 4