



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00255

(22) Data de depozit: 22.03.2010

(41) Data publicării cererii:
30.09.2011 BOPI nr. 9/2011

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• POPOVICI STELA, STR. FĂINARI NR. 26
BL. 50 SC. C ET. 2 AP. 74 SECT.2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• ALBULESCU VIOREL LIVIU,
STR. DRUMUL TABEREI NR. 39, BL. OS4,
SC. 4, ET. 8, AP. 154, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• VELEA SANDA, STR. ZAMBILELOR
NR. 6, BL. 60, ET. 2, AP. 5, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PĂSĂRIN DIANA,
STR. ALEEA MASA TĂCERII. BL.B, AP.18,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• RĂCEANU GHEORGHE, STR. CUPOLEI
NR.7 BL.2A SC.1 AP.47 SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A BIOFILMULUI LIPOLITIC ÎN
SCOPUL REDUCERII GRĂSIMILOR REZIDUALE ULEIOASE**

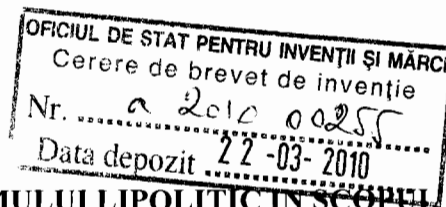
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biofilm microbial, utilizat pentru degradarea suspensiilor uleioase, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Biofilmul conform invenției este stabil, rezistent la o temperatură de 4...39°C, o umiditate de 0,1...100%, pH de 4...12. Procedeu conform invenției constă din cultivarea unei tulpini de *Pseudomonas putida* - ICECHIM pe un mediu lichid, timp de 16...18 h, la temperatura de 37°C, când se

dezvoltă până la 6 ori 10^8 celule/ml/final, după care la acest mediu inoculat se adaugă 2% ulei de floarea-soarelui și 0,5% detergent, și se utilizează pentru imersarea unor plăci timp de 30 de zile, din care rezultă un biofilm rezistent la temperatura de 12...20°C și o valoare pH de 5,5...10,5.

Revendicări: 3





PROCEDEU DE OBTINERE A BIOFILMULUI LIPOLITIC ÎN SCOPUL REDUCERII GRASIMILOR REZIDUALE ULEIOASE

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția de față se referă la un biofilm microbial lipolitic utilizat la reducerea grasimilor reziduale uleioase și procedeu de obținere a acestuia.

În scopul reducerii grasimilor uleioase reziduale este folosită în mod curent metoda fizico-chimică cu surfactanți anionici și neionici care prezintă dezavantajul că aduce prejudicii grave mediului până la modificarea / distrugerea biotopului.

În literatura de specialitate sunt cunoscute procedee care utilizează biofilme lipolitice formate pe granule de siliciu și poliuretan în scopul reducerii lipidelor și acidului oleic de la fabricarea laptelui, care până atunci nu au făcut obiectul unor tratări speciale ci s-au utilizat metode de inginerie pentru separarea fizică a grasimilor (Liu Qingwei și colab.).

Biofilmul lipolitic matur, în formă ireversibilă, se caracterizează prin aceea că este stabil, necesită forțe puternice pentru a fi dislocat, crește și se dezvoltă pe baza grasimilor uleioase reziduale pe care le transformă în substanță organică proprie, este rezistent la variații mari ale factorilor de mediu: temperatura 4-39⁰ C, umiditate 0,1-100%, pH=4-12, cantități mici de nutrienți până la urme, detergenți 0,5-2%, dezinfectanți 0,1-5%.

Pentru obținerea biofilmului lipolitic conform invenției, s-a pornit de la *Pseudomonas putida* izolată din mediu natural cu conținut de grăsimi uleioase. Procedeu de obținere a biofilmului prevede următoarele etape: izolarea microorganismului pe mediu 7329A – Acumedia Manufacturers; examinarea microscopică a caracteristicilor morfologice; identificarea microorganismului cu ajutorul testelor API 20 NE; precum și metode moleculare de izolare și analiză RFLP a genei ARNr 16s la *Pseudomonas putida*; etalarea microorganismelor pe suprafața suportului imersat cu emulsie 0,1-2%; adeziunea inițială care este cuprinsă între 3 și 10 zile, numită și reversibilă, și adeziunea ireversibilă a microorganismelor, cuprinsă între 10 și 30-60 zile, când biofilmul este matur, crește și se extinde rapid, prin desprinderea unor celule de diseminare care populează spații libere ale suportului și formează noi biofilme.

Modul de formare și funcționare a biofilmelor cu caracteristici lipolitice în biodegradarea suspensiilor uleioase a fost evaluat consecutiv cu dinamica de consum a oxigenului și diminuarea substanțelor extractibile cu solvenți organici. Astfel, în condiții de aerare-recirculare a suspensiilor uleioase care imersează biofilmul, se modifică balanța hidrofil-liofilă, formându-se particule coloidale care permit descompunerea lipidelor, făcându-le accesibile ca sursă energetică pentru creșterea biofilmului.

Prin aplicarea inventiei se obtin biofilme lipolitice care elimina grasimile uleioase, emulsionandu-le si utilizandu-le ca substrat energetic pentru propriile nevoi de hrana, rezultand astfel o biomasa celulara care, prin prelucrare ulterioara, poate constitui o sursa de noi valori materiale. Se da in continuare un exemplu de realizare a inventiei.

Pentru verificarea formarii si functionarii biofilmului microbial se folosesc tulpini de *Pseudomonas putida-ICECHIM*, care in stare aderenta au o crestere mai intensa si o activitate metabolica mai mare comparativ cu bacteriile aflate in suspensie. Aceasta tulpina se incadreaza in gama de microorganisme care au proprietati ecofiziologice similare cu membrii genului *Pseudomonas*, cunoscute sub termenul generic de pseudomonade. Din punct de vedere morfologic acestea sunt : Gram(-) nesporulate, bastonase drepte sau curbate, avand dimensiuni intre 0,5-1,0 μm si 1,5-5,0 μm , prezinta mobilitate prin intermediul unuia sau mai multor flageli polari. Din punct de vedere fiziologic caracteristicile sunt : nutritia chemoorganoleptica, metabolism aerob, absenta fermentatiei, absenta fotosintezei, incapacitatea de a fixa azot si capacitatea de a creste si a se dezvolta pe o varietate larga de substraturi organice.

Pentru a obtine un biofilm microbial intr-un timp cat mai scurt se procedeaza la cultivarea in suspensie a unei tulpini de *Pseudomonas putida-ICECHIM* pe mediu lichid 7279A- Acumedia Manufacturers, timp de 16-18 ore, in conditii de aerare-agitare la 140 rpm si temperatura de 37⁰ C, care este temperatura optima pentru acest microorganism. In aceste conditii dezvoltarea a fost puternica, de la 1,5x10² celule/ml initial pana la 6x10⁸ celule/ml final. Acest mediu inoculat, la care s-a adaugat 2% ulei de floarea soarelui si 0,5% detergent, a fost utilizat pentru imersarea unor placi de sticla, inox si polimeri la temperatura mediului ambiant de 20⁰C.

Dupa 3 zile de imersare placile sunt spalate in jet de apa si se constata slabe urme de biofilm care dispar la raziure. Acesta este o forma de biofilm incipient reversibil cu activitate slaba. Dupa 10 zile de imersare biofilmul nu mai este in totalitate inlaturat de jetul de apa si opune rezistenta la indepartarea prin raziure, iar dupa 30 zile de imersare devine ireversibil, matur, creandu-se o adeziune a microorganismelor sesile la suport, datorita interactiunii dintre moleculele complementare de pe suprafetele microorganismelor si suprafetele de atasare. Acest biofilm devine rezistent si adaptabil la variatiile parametrilor de crestere : temperatura 10-20⁰C, natura substratului energetic 2% pana la urme, pH = 5,5-10,5.

In toate cele trei stadii de dezvoltare a biofilmului s-au facut evaluari asupra cresterii sale prin estimarea numerica a microorganismelor lipolitice viabile si asupra activitatii sale prin masurarea CCO_{cr}, TDS, pH, substante extractibile cu solventi organici, TSS, detergenti sintetici biodegradabili.

Se da mai departe descrierea activitatii biofilmului fixat pornind de la culturi in suspensie.

Timp	CCO _{cr} , mg O ₂ / dm ³	Substante dizolvate TDS, μS/cm	pH	Substante extractibile cu solvenți organici, mg/dm ³	Materii in suspensie TSS, mg/dm ³	Detergenți sintetici biodegra- dabili, mg/dm ³	Numar celule viabile / mm ²
Faza initiala	13800	6500	8	20000	1400	500	celule in suspensie
Dupa 3 zile	13710	6400	8	18000	1350	475	celule aderente 0,5x10 ²
Dupa 10 zile	13100	5000	7	11000	1200	461	celule aderente 2x10 ⁴
Dupa 30 zile	9150	2500	7	30	950	295	celule aderente 6x10 ⁶
Dupa 60 zile	125	1900	7	18	300	24	celule aderente 8x10 ⁹

REVENDICARI

1. Biofilm lipolitic microbial *Pseudomonas putida-ICECHIM* utilizat la reducerea grasimilor uleioase reziduale, caracterizat prin aceea ca este stabil si necesita forte puternice pentru a fi dislocat, creste si se dezvolta pe baza grasimilor uleioase pe care le transforma in substanta organica proprie, rezistent la variatii mari ale factorilor de mediu : temperatura 4-39⁰C, umiditate 0,1-100%, pH=4-12, detergenti sintetici biodegradabili 0,5-2%, dezinfectanti 0,1-5% si cantitati variabile de nutrienti, in cazul de fata 2% pana la 0,18%.

2. Procedeu de obtinere a biofilmului lipolitic microbial format in 30-60 zile din *Pseudomonas putida-ICECHIM*, caracterizat prin aceea ca se porneste de la culturi *Pseudomonas putida-ICECHIM* in suspensie la care se adauga 2% ulei de floarea soarelui si 0,5% detergent pentru a fi imersat pe placi de sticla, inox si polimeri la temperatura mediului 18-20⁰C.

3. Procedeu de obtinere a biofilmului lipolitic conform revendicarii 2, caracterizat prin aceea ca reduce incarcatura organica la 60 zile de la formare, semnalata de indicatori fizico-chimici, conform metodelor standard, dupa cum urmeaza : CCO_{cr} de la 13800 la 125 mg O₂/dm³, reducere la 2,61% ; TDS de la 6500 la 1900 μS/cm, reducere la 29,23% ; substante extractibile cu solventi organici de la 20000 la 18 mg/dm³, reducere la 0,09% ; detergenti sintetici biodegradabili de la 500 la 24 mg/dm³, reducere la 4,8%.