



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00343

(22) Data de depozit: 18/05/2015

(41) Data publicării cererii:
26/02/2016 BOPI nr. 2/2016

(71) Solicitant:
• CORAX-BIONER CEU S.A.,
PIAȚA LIBERTĂȚII NR.1, ET.3, CAM.319,
MIERCUREA-CIUC, HR, RO

(72) Inventatori:
• ABRAHAM BEATA,
STR. MIHAI EMINESCU NR. 1, SC.A, AP.22,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LANYI SZABOLCS, STR.MIKO NR.21,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• MARA GYONGYVER, PIAȚA LIBERTĂȚII
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• KOVACS ERIKA, NR.240, SÂNSIMION,
HR, RO;
• LASLO EVA, BD. FRĂȚIEI NR. 2, SC. E,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;

• BALINT EMESE, ALEEA AVÂNTULUI
9/B/14, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• MESZAROS ALEXANDRU,
ALEEA CIOCÂRLIEI NR.9, SC.B, AP.19,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• KADAR ATTILA, NR. 577, BIXAD, CV, RO;
• SINKLER REKA, STR.CSASZAR BALINT
NR.1, 14/B/13, SFÂNTU GHEORGHE, CV,
RO;
• TORO SZABOLCS, STR. SOMEȘULUI US
19, SATU MARE, SM, RO;
• MATHE LORAND, NR. 1054,
SÂNDOMINIC, SM, RO;
• FUNKENHAUSER BERNADETT,
ALEEA CLĂBUCET NR. 11, 4/90,
SATU MARE, SM, RO;
• DOBRI EMOKE, STR. PRINCIPALĂ
NR. 619, SATUL TURIA, CV, RO;
• BECZE ANNAMARIAL,
MIERCUREA CIUC, HR, RO

(54) BIOPREPARAT MICROBIAN CU EFECT CONSERVANT
ASUPRA PLANTELOR FURAJERE, COMPUS DIN
LACTOBACILLUS BREVIS

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biopreparat microbial cu efect conservant asupra plantelor furajere. Biopreparatul conform invenției este constituit dintr-o tulpină *Lactobacillus brevis* KLII.1, depusă cu număr de înregistrare NCAIM (P) 8001435, fiind o bacterie lactică autohtonă, izolată din zeamă de varză obținută prin

fermentare spontană, utilizată la însilozarea plantelor din pășiști montane, cu efect benefic asupra conservării furajului.

Revendicări: 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).



BIOPREPARAT MICROBIAN CU EFECT CONSERVANT ASUPRA PLANTELOR FURAJERE COMPUS DIN *LACTOBACILLUS BREVIS*

Prezenta invenție se referă la un biopreparat microbial compus dintr-o tulpină bacteriană lactică și la procedeul de utilizare a acestuia în procedeul de tratare a plantelor furajere din pașiti montane cu aceasta.

Bacteriile lactice cuprind o largă varietate de genuri cu un număr considerabil de specii. Aceste microorganisme sunt Gram-pozitive, catalazo-negative și se dezvoltă în condiții de microaerofilie în condiții strict anaerobe și nu se formează spori.

Din punct de vedere filogenetic bacteriile Gram- pozitive se împart în două ramuri: bacteriile Gram-pozitive (cu excepția bifidobacteriilor) cu conținut redus de guanină +citozină (<50%) și bacterii similare cu bacterii lactice având în vedere proprietățile fiziologice și biochimice și care colonizează tractul gastrointestinal la animale și oameni (Banu, 2008).

Bacteriile lactice includ diferite genuri ca *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* și *Lactobacillus*.

Speciile de bacterii lactice pot fi grupate în funcție de mecanismul de fermentare a substratului glucidic și de natura produșilor finali, specii homofermentative. Aceste tulpini bacteriene lactice realizează conversia zaharurilor în acid lactic pe calea glicolizei, calea Embden-Meyerhof-Parnas și specii heterofermentative sau numit și heterolactice, realizează conversia zaharurilor, hexozelor și pentozelor pe calea ciclului pentozofosfatului, în acid lactic, acid acetic, etanol și CO₂ (Zarnea și Popescu, 2012).

Bacteriile lactice au un rol important în procesele fermentative ale plantelor utilizabile la obținerea furajelor însilozate.

Folosirea culturilor starter de bacterii lactice asigură produselor în care se introduc un anumit grad de inocuitate.

Această inocuitate este realizată deoarece bacteriile lactice produc:

- acizi organici, în principal acid lactic, dar și acid acetic, alcool, CO₂;
- substanțe bacteriocine eliberate în mediul de cultură;
- peroxizi organici (H₂O₂);

Aceste microorganisme pot intra în competiție cu alte microorganismele patogene și cele de alterare în ceea ce privește consumul de substanțe nutritive, iar datorită și acidificării mediului, consecință a acumulării acizilor organici, bacteriile patogene și de alterare sunt inhibitate în dezvoltarea lor. Dintre bacteriile patogene sunt inhibitate salmonellele, stafilococii, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* etc. (Costin, 2005).

Baza însilozării constă în menținerea stabilității și valorii nutritive a furajelor în timp cât mai lung, până la hrănirea animalelor cu acestea. Acest proces are loc în condiții anaerobe, în care acidul lactic produs de bacterii lactice inhibă proliferarea microorganismelor patogene, care sunt mai puțin tolerante față de condiții acide. Astfel, prin reducerea pH-ului scad și pierderile la însilozare datorită conversiei mai mare de carbohidrați solubili a plantelor (fiind substratul principal al bacteriilor lactice) în acid lactic, cu o rată de 96,9% de recuperare a energiei. Cele mai importante glucide solubile prezente în culturile furajere sunt fructoza, glucoza, zaharoză și fructozani, din care sucroza și fructozan sunt hidrolizați rapid în monomerii lor (Santos și colab., 2013).

Se cunosc mai multe proceduri de însilozare prin fermentație lactică. Brevetul **EP 0369198 B1** descrie un procedeu de coservare a plantelor furajere prin utilizarea tulpinei bacteriene *Lactobacillus plantarum* împreună cu o enzimă celulază și alte aditivi de origine de acid organic. Acest brevet descrie procedeul obținerii unui furaj fermentat cu valori nutriționale îmbunătățite și cu efecte benefice asupra sănătății animalelor.

Un alt brevet (**RO 119062 B1**) descrie la fel utilizarea unei tulpini *Lactobacillus plantarum* cu care se însămânțează materiile vegetale greu însilozabile cum ar fi lucerna sau cocenii de porumb și tăietei de sfeclă epuizată. Invenția descrie un procedeu de conservare a plantelor furajere greu însilozabile.

Brevetul **RO 85921** descrie un procedeu utilizabil pentru însilozarea plantelor furajere în care înainte de însilozare se folosește un factor care degradează polisaharidele în zaharuri fermentescibile, constituit din enzime (celulază și amilază fungică) și un consorțiu de bacterii (bacterii gram-negativ aparținând familiei *Enterobacteriaceae*).

Această invenție se referă la tulpina de *Lactobacillus brevis* KLE II.1 depusă cu număr de înregistrare **NCAIM (P) B001435** la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, care prin producerea acidului lactic are un rol în conservarea plantelor furajere. Este un alt obiect al acestei invenții de a utiliza tulpina în procedeul de tratare a plantelor furajere din pașiti montane.

Tulpina *Lactobacillus brevis* KLE II.1 este izolată din mediu natural, din varză de zeamă obținut prin fermentare spontană. Izolarea acestei tulpini s-a realizat pe mediu nutritiv selectiv MRS. Fiind luat în considerare necesitățile nutriționale ale bacteriilor lactice, mediul MRS este compus din glucide fermentabile și vitamine din complexul B, acizi nucleici, proteine și produșii lor de degradare, acizi grași nesaturați liberi, elemente minerale. Compoziția exactă a mediului MRS în gram/litru: pepton universal: 10.0, extract din carne 5.0, extract din drojdii 5.0, D(+)-glucoză 20.0, acetat de sodiu 5.0, sulfat de magneziu 0.1, sulfat de mangan 0.05, fosfat de hidrogen dipotassium 2.0, citrat de hidrogen diamoniac 2.0, agar 12.0, pH final 6.5 +/- 0.2 la 25°C. Compoziția mediului Rogosa în gram/litru: tripton 10.0, extract din drojdii 5.0, dextroză 10.0, arabinoză 5.0, zaharoză 5.0, acetat de sodiu 15.0, citrat de amoniu 2.0, fosfat de

monopotasiu 6.0, sulfat de magneziu 0.57, sulfat de mangan 0.12, sulfat de fier 0.03, polisorbitat 1.0, agar 15.0.

În scopul caracterizării tulpinei izolate s-au aplicat metodele de determinare a caracterelor morfologice celulare prin colorația Gram, a celor biochimice prin producerea de gaze, evidențierea catalazei, toleranța față de clorura de sodiu (4%, 6.5%).

Conform acestor analize tulpina are următoarele caracteristici:

Încadrare taxonomică:

Pe baza similarității secvenței 16S rADN (878 bp.) cu tulpinile din GenBank procentul de similaritate cu tulpina bacteriană *Lactobacillus brevis* ATCC 14687 este 100%.

Caractere morfologice și de cultură: Gram -pozitivă

Caractere fiziologice și biochimice: utilizarea diferitelor substraturi

Tabel 1.: Utilizarea diferitelor substraturi

Caractere fiziologice/biochimice	<i>Lactobacillus brevis</i> KLE II.1
D-maltoză	+
D-trehaloză	-
D-cellobioză	-
Gentiobioză	-
Sucroză	-
D-turanoză	-
pH 6	+
pH 5	-
D-raffinoză	-
α -D-lactoză	-
D-melibioză	+
β -methyl-D-glucosidă	-
D-salicină	-
N-acetyl-glucozamine	+
NaCl, 1%	-
α -D-glucosă	+
D-manoză	-
D-fructoză	+
D-galactoză	-

Inozină	-
Lactat de sodiu, 1%	+
D-serină	-
D-sorbitol	-
D-manitol	-
Glicerol	-
Rifamycină SV	+
Minocyclină	-
Acid D-galacturonic	+
Acid D-gluconic	+
Acid D-glucuronic	+
Vancomycină	+
L-alanină	+
Acid L-lactic	-
Acid Nalidixic	+
Telurit de potasiu	+
Aztreonam	+

Rezistență la antibiotice:

	Amp.	Tetr.	Chlo.	Kan.	Str.	Pen.	Gent.
<i>Lb. brevis</i> KLEII.1	4	16	16	> 128	> 128	8	32

Tulpina *Lactobacillus brevis* KLE II.1 izolată, conservată și dezvoltată pe mediu lichid s-a folosit ca inocul pentru însămânțarea plantelor furajere în procesul de microînsilozare în condiții de laborator.

Problema pe care o rezolvă invenția de față este de a realiza un produs biologic pe bază de bacterie lactică utilizat ca inocul la însilozarea plantelor din pajiști montane cu efect benefic asupra conservării furajului.

În continuare invenția și utilizarea acestuia va fi descrisă în detaliu în următoarele exemple:

Exemplu 1.

Plantele originare de la pajiști montane au fost tăiate la o lungime de 20-40 mm. 100 g din plantele proaspăte au fost însilozate în pungi de polietilena, ambalate și sigilate anaerob cu ajutorul unui mașini de ambalat.

Tulpinile bacteriene au fost cultivate în mediu nutritive MRS timp de 48 h. Acest inoculant a fost aplicat pentru tratarea ierbii: 100 g plantă a fost inoculat cu 1 ml de inoculant cu $2 \cdot 10^7$ unități formatoare de colonii.

Exemplu 2.

Conținutul furajului în proteină după o fermentație de o durată de 30 zile tratat cu *Lactobacillus brevis* KLE II.1 arată o diferență semnificativă ($p < 0,05$) față de probele de martor. Inocularea cu tulpina bacteriană lactică a favorizat în mod pozitiv și reducerea procesului de degradare a proteinelor în timpul fermentației.

Tratarea cu această tulpină nu contribuie la apariția unei diferențe semnificante ($p > 0,05$) a conținutului de ADF față de control, ceea ce înseamnă că tratamentul nu are influență asupra conținutului de celuloză și lignină. Însă se poate observa diferență semnificativă ($p < 0,05$) față de control în cazul conținutului de NDF, astfel în cazul conținutului de hemiceluloză. Conținutul de NDF și în mod proporțional conținutul de hemiceluloză a scăzut față de probele de control.

Tabelul 2.: Conținutul de ADF, NDF și hemiceluloză în f furajul tratate cu *Lactobacillus brevis* KLE II.1 și în porbele de martor

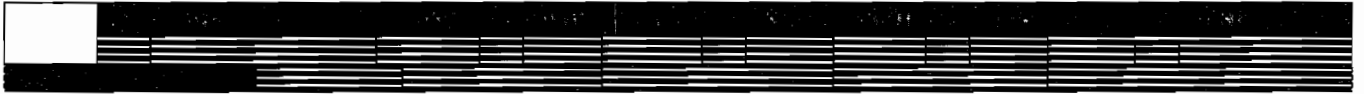
Nr.	Probă	CP (g/kg s.u.)			ADF (g/kg s.u.)			NDF (g/kg s.u.)			Hemiceluloză (g/kg s.u.)		
			±			±			±			±	
1	Martor	112,92	±	7,90	352,8	±	2,60	475,5	±	1,67	122,75	±	0,96

Exemplu 3.

În cazul conținutului de acid lactic, acid acetic, acid propionic, probele tratate cu *Lactobacillus brevis* arată o diferență semnificativă ($p < 0,05$) față de probele netratate.

Tabelul 3.: Conținutul de acid lactic, acid acetic, acid propionic și valoarea de pH în probele de siloz de iarbă tratate cu *Lactobacillus brevis* și porbele de martor.

Zile de însilozare	Probe	pH			Acid lactic g/kg s.u.			Acid acetic g/kg s.u.			Acid propionic g/kg s.u.		
			±			±			±			±	
3	1 Control	4,86	±	0,03	27,04	±	0,79	2,79	±	0,61	nd		
	2 LbB	4,83	±	0,08	68,80	±	1,14	12,95	±	0,71	9,79	±	3,59
17	1 Control	4,70	±	0,05	61,41	±	0,53	8,59	±	0,12	nd		
	2 LbB	4,70	±	0,04	70,38	±	0,99	12,25	±	0,50	1,82	±	0,27
60	1 Control	4,68	±	0,05	65,61	±	3,34	10,78	±	0,15	nd		



Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- prin acest invenție se dă o propunere pentru o tulpină bacterie lactică cu efect benefic asupra promovării procesului de însilozare a plantelor din pajiști montane
- tulpina bacteriană este tulpină bacteriană lactică autohtonă
- prin producerea de acid lactic contribuie la îmbunătățirea însilozării furajului
- baza unui nou produs în agricultura durabilă care îmbunătățește calitățile nutritive ale furajului realizat din a plantelor din pajiști montane

REVENDICARE

1. Tulpina de *Lactobacillus brevis* KLE II.1, depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numar de înregistrare NCAIM (P) B001435, bacterie lactică autohtonă izolat din zeamă de varză obținut prin fermentare spontană, este perspectivă pentru utilizare ca tulpină benefică, pentru promovarea însilozării plantelor din pașiți montane.
2. Procedeu de obținere a unui furaj fermentat, **în urma inoculării cu un produs biologic**, prin cultivarea unei tulpini de bacterie lactică *Lactobacillus brevis* KLE II.1, în condiții anaerobe, pe un mediu lichid MRS.
3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că plantele din pașiți montane este tratat cu tulpina bacteriană** cu o cantitate de $2 \cdot 10^7$ unități formatoare de colonii/ml.