



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00344

(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;
• MATHE ISTVAN,
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LASLO EVA, BD. FRĂȚIEI NR. 2, SC. E,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;

• ORBAN KALMAN CSONGOR,
CART. FLORILOR, BL, C, SC. 2, AP. 6,
SOVATA, MS, RO;
• BODOR ZSOLT, BD. TIMIȘOAREI NR. 49,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• TANCZOS SZIDONIA, NR. 590,
SÂNCRĂIENI, SM, RO;
• FEJER KIRALY GERGELY, NR. 701,
CIUMANI, SM, RO;
• KONCZ MIHALY, STR. OITUZ NR.8
44/A/6, TÂRGU SECUIESC, CV, RO;
• TORO SZABOLCS, STR. SOMEȘULUI US
19, SATU MARE, SM, RO;
• FUNKENHAUSER BERNADETT,
ALEEA CLĂBUCET NR. 11, 4/90,
SATU MARE, SM, RO;
• DOBRI EMOKE, STR. PRINCIPALĂ
NR. 619, SATUL TURIA, CV, RO

(54) **PROCEDEU DE IZOLARE ȘI CARACTERIZARE A UNEI
TULPINI DE BACTERIE LACTICĂ BENEFICĂ, CU ROL ÎN
PROMOVAREA PROCESULUI DE ÎNSILOZARE A
PLANTELOR FURAJERE**

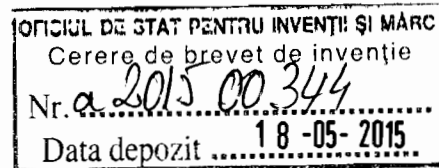
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei tulpini de bacterie lactică având rol în promovarea procesului de însilozare a plantelor furajere. Procedeu conform invenției constă în izolarea tulpinii din probe de cașcaval obținut prin fermentare spontană, tulpina lactică izolată este depusă cu număr de înregistrare NCAIM (P) B001436, *Lactobacillus plantarum subs.*

plantarum, fiind gram-pozitivă, catalazo-negativă, sub formă de bastonaș din punct de vedere morfologic, fiind o tulpină benefică pentru promovarea însilozării plantelor furajere.

Revendicări: 1





PROCEDEU DE IZOLARE ȘI CARACTERIZARE A UNEI TULPINI DE BACTERIE LACTICĂ BENEFICĂ CU ROL ÎN PROMOVAREA PROCESULUI DE ÎNSILOZARE PLANTELOR FURAJERE.

Invenția se referă la un procedeu de izolare și caracterizare a unei tulpini de *Lactobacillus plantarum* care poate fi utilizată ca tulpină benefică pentru promovarea însilozării plantelor furajere.

Bacteriile lactice cuprind o largă varietate de genuri cu un număr considerabil de specii, cu rol în diferite procese biotehnologice. Aceste microorganisme sunt Gram-pozitive, catalazo-negative și se dezvoltă în condiții de microaerofile sau sunt strict anaerobe și nu se formează spori (Banu, 2008). Speciile de bacterii lactice pot fi grupate în funcție de mecanismul de fermentare a substratului glucidic și de natura produșilor finali. Se deosebesc specii homofermentative, realizând conversia zaharurilor pe calea glicolizei, calea Embden-Meyerhof-Parnas și specii heterofermentative sau numit și heterolactice, realizând conversia zaharurilor, hexozelor și pentozelor pe calea ciclului pentozofosfat (Zarnea și Popescu, 2012).

Bacterii lactice au un rol important în procesele fermentative ale plantelor utilizabile la obținerea furajelor însilozate datorită diferitelor proprietăți. Produc diferite acizi organici, în principal acid lactic, dar și acid acetic, alcool, CO₂. Unele bacterii lactice sunt antagoniste față de alte microorganisme prin producerea bacteriocinelor și peroxidului de hidrogen (H₂O₂). Antagonismul lor se poate manifesta și printr-o competiție nutrițională (Costin, 2005). Prin reducerea pH-ului inhibă proliferarea microorganism patogene și de alterare permițând conservarea valorii nutritive a furajului.

Se cunosc mai multe proceduri de însilozare unde se aplică ca aditivi biologici bacterii lactice cu rol benefic asupra fermentației.

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 procedeu 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 are fi lucerna sau cocenii de

porumb și tăieței de sfeclă epuizați. 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 complex de bacterii (bacterii gram-negativă al familiei *Enterobacteriaceae*).

Problema pe care o rezolva invenția este de a izola și caracteriza o tulpină de bacterie lactică ca tulpină benefică cu rol în promovarea procesului de însilozare plantelor furajere.

Prin realizarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- prin acest invenție se dă o propunere pentru o tulpină bacterie lactică microbiană cu efect benefic asupra promovării procesului de însilozare
- tulpina bacteriană este tulpină bacteriană lactică autohtonă
- prin producerea de acid lactic contribuie la îmbunătățirea însilozării furajelor
- baza unui nou produs în agricultura durabilă care îmbunătățește calitățile nutritive ale furajelor
- bacteriile sunt ușor de cultivate

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției (problema tehnică):

Faza 1. Izolarea și identificarea tulpinii bacteriene lactice

Izolarea tulpinii bacteriene lactice s-a realizat din produs fermentat tradițional, cașcaval pe mediu nutritiv selectiv MRS (Compoziția exactă a mediului MRS în gram/litru: pepton universal: 10.0, extract din carne 5.0, extract din drojii 5.0, D(+)-glucoză 20.0, acetat de sodiu 5.0, sulfat de magneziu 0.1, sulfat de mangan 0.05, fosfat de hidrogen dipotasiu 2.0, citrat de hidrogen diamoniac 2.0, agar 12.0, pH final 6.5 +/- 0.2 la 25°C). 10 g de cașcaval fermentat tradițional a fost suspendată în 10 ml soluție fiziologică (0,9% NaCl) din care a fost realizat diluții seriale zecimale și însămânțat pe suprafața mediului nutritiv selectiv MRS. Incubarea plăcilor însămânțate a fost realizată la 37°C în condiții de anerobioză.

Din coloniile pure obținute tulpina bacteriană a fost selectată pe baza proprietăților specifice a bacteriilor lactice: aspectul microscopic, caracterul gram și reacția catalazei.

Conform rezultatelor izolatul bacterian lactic selectat a fost identificat genetic respectiv clasificat genotipic prin amplificarea genei ARNr 16S.

Pentru izolarea ADN-ului bacterian s-a utilizat un kit de extracție (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit), și a fost realizat pe baza instrucțiunilor de utilizare marcate de producător.

Amplificarea genei 16S ribosomal prin tehnica PCR s-a realizat cu 2 amorse special proiectate pentru organisme procariote: 27 f și 1492 r.

Identificarea a tulpinilor bacteriene a fost realizată pe baza secvențializării fragmentului 16S rADN (Tabel 1.)

Tabel1. Incadrarea taxonomică a tulpinei bacteriene pe baza secvențelor 16S rADN

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN (perechi de baze - pb)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinilor pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank (nr. de referință); - procentul de similaritate
Izolatul bacterian	867	TCGGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGG AAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCG TTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGCTACCCATACTTTTCGAG CCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAG CCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATA TATCTACGCATTCACCGCTACACATGG AGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAG TTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGG TTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACT TAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTACG CCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCA CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC GTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAAT ACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTC AGATATGTTCTTCTTAAACAACAGAGTT TTACGAGCCGAAACCTTCTCACTCAC GCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCC ATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC CCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGT CCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGG TCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAG CCGTTACCCACCATCTAGCTAATACG CCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCC GAAGCCATCTTCAAGCTCGGACCATG CGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGC ATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCGCTT CTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCAC CAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAAT CATGATGCAAGCACCAATCAATACCAG AGTTCGTTGACTTGCATGTATTAGGCA CGCCGCCAGCGTTCGTC	<p style="text-align: center;"><i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T) 100%</p>

Faza 2. Determinarea utilizării a diferitelor surse de carbon și senzitivitate chimică

Caracterizarea fenotipică a tulpinii bacteriene lactice identificată a fost realizată cu ajutorul sistemului BiologMicrolog GenIII.

Tabel 2. Rezultatele cele mai relevante a utilizării diferitelor substrat

Substrat	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>
D-Maltose	+
D-Trehalose	
D-Cellobiose	
Gentiobiose	
Sucrose	
D-Turanose	
pH 6	
pH 5	
D-Raffinose	
α -D-Lactose	+
D-Melibiose	
β -Methyl-D-Glucoside	
D-Salicin	
N-Acetyl-DGlucosamine	+
1% NaCl	
α -D-Glucose	+
D-Mannose	+
D-Fructose	
D-Galactose	
Inosine	
1% SodiumLactate	
D-Serine	
D-Sorbitol	
D-Mannitol	+
Glycerol	
Rifamycin SV	
Minocycline	
D-GalacturonicAcid	
D-GluconicAcid	
D-GlucuronicAcid	
Vancomycin	
L-Alanine	
L-LacticAcid	
NalidixicAcid	
PotassiumTellurite	
Aztreonam	

Faza 3. Determinarea rezistenței față de antibiotice prin detectarea concentrației minime inhibitorii

Rezistența la antibiotice a bacteriilor este o caracteristică care îi conferă proprietăți prin care bacteriile devin deloc sau doar puțin sensitive la efectele dăunătoare ale antibioticelor.

Rezistentabacteriilor la antibiotice poate fi de două tipuri: rezistență naturală sau primară și rezistență dobândită sau secundară.

Examinarea s-a realizat astfel: mediile lichide MRS cu antibioticele testate cu diferite concentrații u fost inoculate cu tulpina bacteriană și incubat timp de 48 ore la o temperatură de 37 °C. După o nouă incubare, s-a determinat OD față de mediul nutritiv lichid MRS control la o lungime de undă de 600 nm.

Concentrația antibioticelor a fost: 0,01mg/ l; 0,02mg/ l; 0,04mg/ l; 0,08mg/ l; 0,16mg/ l; 0,32mg/ l; 0,64mg/ l; 1,28mg/L.

Tabelul 3. Rezultatul determinării MIC la antibiotice a tulpinei bacteriene lactice *Lactobacillus plantarum subs. plantarum* prin măsurarea OD

C _{antibiotic} (m/V) [mg/L]	Ampicilină	Tetraciclină	Cloramfenicol	Kanamicină	Streptomicină	Penicilină	Gentamicină
	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]	Abs [600 nm]
0	1,9808	1,9808	1,8920	1,8919	1,9838	1,9355	1,8944
0,01	0,2754	1,9857	1,9293	1,9245	1,9473	0,2406	1,8788
0,02	0,4239	1,9805	1,9080	1,8766	1,9612	0,2198	1,8998
0,04	0,1683	1,9301	1,3192	1,9534	1,9622	0,2567	1,9206
0,08	0,1803	1,5686	0,1482	1,8911	1,9342	0,1947	1,8459
0,16	0,1634	0,4852	0,1137	1,9340	1,9240	0,1203	1,7897
0,32	0,1467	0,1952	0,0543	1,9538	1,9200	0,1051	1,7681
0,64	0,1516	0,1914	0,0367	1,9556	1,7269	0,1155	1,5783
1,28	0,1323	0,1378	0,0509	1,8049	0,5912	0,1156	0,1207

Faza 4. Evaluarea capacității de producere de acid lactic în prezența diferitelor surse de C
Conservare furajelor prin însilozare are șa bază și bioconversia zaharurilor fermentescibile.

Rolul benefic asupra conservării furajelor a tulpinei bacteriene *Lactobacillus plantarum subs. plantarum* a fost descris prin determinarea capacității de fermentare în trei medii diferite cu

sursele de carbon: glucoză, gluză și xiloză și cereale uscate de distilerie solubile din porumb (DGGS).

Concentrația acidului lactic și acetic a fost determinată prin metode de cromatografie lichidă de înaltă performanță, HPLC, tip Varian Pro Star 210 echipat cu coloană Coregel-87H3 (Transgenomic). Cafază mobilă s-a utilizat soluție de H₂SO₄ în concentrație de 0,008 M cu un debit de 0,6 ml/min și temperatură coloane fiind de 50°C. Pentru determinarea concentrațiilor acizilor am pregătit curbă de calibrare.

Tabel 4. Concentrația acidului lactic și acidului acetic rezultat din procesul de fermentație în prezența

<i>Lactobacillus plantarum subs. plantarum</i>	Timpul de fermentație h				
	24	36	48	60	72
Sursa de carbon utilizat: glucoza					
Acid lactic g/l	25.529	26.420	26.910	37.364	39.092
Acid acetic g/l	1.893	1.974	1.926	2.274	7.839
Sursa de carbon utilizat: glucoza și xiloză					
Acid lactic g/l	28.215	20.2995	28.1565	22.32	28.098
Acid acetic g/l	2.037	3.267	3.339	1.77	3.999
Sursa de carbon utilizat: DGGS					
Acid lactic g/l	4.464	5.202	6.9255	4.5945	5.8005
Acid acetic g/l	1.761	3.48	1.995	3.267	2.097

REVENDICARE

1. Tulpina *Lactobacillus plantarum* subs. *plantarum*, depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numar de înregistrare NCAIM (P) B001436, bacterie lactică autohtonă izolat din probe de cașcaval obținut prin fermentare spontană, este perspectivă pentru utilizarea ca tulpină benefică, pentru promovarea însilozării plantelor furajere.