



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00439**

(22) Data de depozit: **26/06/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2019** BOPI nr. **12/2019**

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

(73) Titular:
• **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;
• **MATHE ISTVAN**,
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, 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;
• **ORBAN KALMAN CSONGOR**,
CART. FLORILOR, BL. C, SC. 2, AP. 6,
SOVATA, MS, RO;

• **BALINT EMESE**, ALEEA AVÂNTULUI
9/B/14, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **BODOR ZSOLT**, BD. TIMIȘOAREI NR. 49,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **MESZAROS ALEXANDRU**,
ALEEA CIOCĂRLIEI NR.9, SC.B, AP.19,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **TANCZOS SZIDONIA**, NR. 590,
SÂNCRĂIENI, HR, RO;
• **FEJER KIRALY GERGELY**, NR. 701,
CIUMANI, HR, RO;
• **KONCY MIHALY**, STR. OITUZ NR. 8,
44/A/6, TÂRGU SECUIESC, CV, RO;
• **MATHE LORAND**, NR. 1054,
SÂNDOMIC, HR, RO;
• **DOBRI EMOKE**, STR. PRINCIPALĂ
NR. 619, SATUL TURIA, CV, RO;
• **BECZE ANNAMARIAL**,
STR. PICTOR NAGY ISTVAN 8/A/20,
MIERCUREA CIUC, HR, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 72540 B1; KR 101380516 B1

(54) **TULPINĂ DE *BACILLUS SP. SZE 102A* UTILIZATĂ
ÎN PROCESUL DE ÎNSILOZARE A PLANTELOR FURAJERE**



RO 130921 B1

1 Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Bacillus sp.* SZE 102A, depozitată cu
2 număr de depozit NCAIMP(B)001437 la National Collection of Agricultural and Industrial
3 Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, Ungaria, utilizabilă în procesul de
4 însilozare a plantelor furajere, având capacitatea de a degrada polizaharide structurale
5 vegetale.

6 Bacteriile producătoare de enzime celololitice sunt foarte valoroase în diferite
7 industrii, cum ar fi industria chimică, textilă, energetică, dar și în agricultură. Fiind consti-
8 tuentul principal al membranelor celulelor vegetale, celuloza reprezintă o substanță organică
9 care apare frecvent. Eliberarea glucidelor din celuloză poate fi realizată pe cale biologică sub
10 acțiunea enzimelor celololitice produse de diferite microorganisme (Hossein et al, 2012).
11 Accelerarea procesului de zaharificare poate fi realizată cu ajutorul unei pretratări fizice
12 și/sau chimice a celulozei.

13 Microorganismele aerobe și anaerobe folosesc diferite strategii în degradarea mate-
14 rialului lignocelulozic. Fungii anaerobi secretă enzime cu activitate celololitică diferită, iar
15 bacteriile anaerobe încorporează celulozele într-o structură legată de suprafața celulei
16 denumită celulosomă (Miller și Blum, 2010). Datorită acestor structuri, microorganismele sunt
17 capabile să crească concentrația efectivă a enzimelor celololitice pe suprafața celulară, și
18 să îmbunătățească activitatea enzimatică datorită funcționării sinergice a acestora (Bayer
19 și colab., 1998).

20 Datorită orientării mai pronunțate spre sursele regenerabile de energie, a crescut
21 interesul pentru microorganismele capabile să descompună celuloza. Scopul cercetărilor a
22 devenit găsirea și caracterizarea unor tulpini celololitice cu proprietatea de degradare mai
23 eficientă. Speciile de bacterii celololitice sunt frecvente în diferite medii, cum ar fi compostul,
24 solul, în ape reziduale, în intestin și în fecalele animalelor. În tabelul 1 sunt enumerate
25 microorganismele celololitice cunoscute și proveniența acestora:

27 *Tabelul 1*

28 *Microorganismele celololitice (după Schwarz 2001; Golan, 2011)*

Denumirea microorganismului	Colorație Gram	Condiția de cultivare	Locul izolării
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	-	anaerob	nămol urban
<i>Bacillus circulans</i>	+	aerob	amidon de cartofi
<i>Bacillus megaterium</i>	+	aerob	miere
<i>Bacillus pumilus</i>	+	aerob	din rizosfera arinului
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	-	anaerob	nămol urban
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	anaerob	stomac, rumegătoarele
<i>Cellulomonas fimi</i>	+	facultativ anaerob	biogaz de putrezire
<i>Cellulomonas fermentam</i>	+	facultativ anaerob	depozite de deșeuri urban
<i>Cellulomonas flavigena</i>	+	facultativ anaerob	din sol agricol
<i>Cellulomonas gelida</i>	+	facultativ anaerob	din sol
<i>Cellulomonas iranensis</i>	+	facultativ anaerob	pădure, sol de humus
<i>Cellulomonas persica</i>	+	facultativ anaerob	pădure, sol de humus

Tabelul 1 (continuare)

Denumirea microorganismului	Colorație Gram	Condiția de cultivare	Locul izolării
<i>Celulomonas uda CB4</i>	+	facultativ anaerob	ape uzate din fabrica de bere
<i>Cellvibrio mixtus</i>	-	aerob	din sol
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	anaerob	din sol
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	+	anaerob	sol, îngrășământ, tract intestinal, iarbă în putrezire
<i>Clostridium cellulofermentans</i>	-	anaerob	compost
<i>Clostridium cellulovorans</i>	-	anaerob	producerea biogazului
<i>Clostridium herbivorans</i>	+	anaerob	stomac de porc
<i>Clostridium hungatei</i>	-	anaerob	solul așchii de lemn în putrezire
<i>Clostridium josui</i>	-	anaerob	din compost
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	-	anaerob	nămol
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	-	aerob	din sol
<i>Erwinia carotovora</i>	-	aerob	patogen vegetal
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	-	anaerob	stomacul vacii, bacterie intestinală celulozolică
<i>Halocella cellulolytica</i>	-	anaerob	lac sărat
<i>Prevotella ruminicola</i>	-	anaerob	stomacul vacii
<i>Pseudomonas fluorescens cellulosa</i>	-	aerob	bacterie saprofită din sol
<i>Ruminococcus albus</i>	+	anaerob	stomac
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	anaerob	stomac
<i>Streptomyces cellulolyticus</i>	+	aerob	din sol
<i>Streptomyces lividans</i>	+	aerob	din sol
<i>Streptomyces reticuli</i>	+	aerob	sol

Se cunosc mai multe proceduri de însilozare unde se aplică ca aditivi biologici enzime celuloolitice și/sau bacterii celuloolitice cu rol în degradarea polizaharidelor structurale.

Brevetul **RO 72540 B1** descrie o tulpină mutantă prototrofă de *Bacillus subtilis* ICCF II 41, care prezintă capacitate crescută de a produce enzime amilolitice.

Brevetul **KR 101380516 B1** se referă la o nouă tulpină de *Bacillus subtilis* IN-55, la o tulpină de *Lactobacillus plantarum* BT-77 și la o metodă de obținere a silozului de plante. Plantele destinate însilozării, utilizate în metoda descrisă, sunt: paie de orez, raigrasul, orzul întreg, orezul întreg, grâul sau porumbul. Cele două tulpini descrise în acest document, prezintă o puternică activitate celulozică, au un efect excelent în scăderea pH-ului și au fost izolate din alimente și sol.

RO 130921 B1

1 Brevetul **EP 0369198 B1** descrie un procedeu de obținere a unor furaje fermentate
cu valori nutriționale îmbunătățite și cu efecte benefice asupra sănătății animalelor, prin utili-
3 zarea unor enzime celulo litice (celulaze și xilanaze), alți aditivi ca acizi organici și a unei
tulpini bacteriene lactice de *Lactobacillus plantarum*.

5 Cererea de brevet **WO 2013096369 A1** prezintă o metodă pentru creșterea digesti-
bilității materialului celulozic. Într-un exemplu de realizarea a invenției se menționează utiliza-
7 rea următoarelor tulpini de *Bacillus sp.* ATCC 700385, NRRL B-50136, NRRL B-50622,
NRRL B-50623, NRRL B-50605, NRRL B-50621, NRRL B-50015, NRRL B-50607, NRRL
9 B-50606, PTA-7543, PTA-7547, pentru tratarea materialului lignocelulozic.

11 În cererea de brevet **WO 2014078716 A1** este descrisă o tulpină bacteriană recom-
binantă utilizată în tratarea materialului lignocelulozic. Această bacterie prezintă pe suprafața
celulară o structură denumită minicelulosomă, caracteristică a tulpinilor bacteriene anaerobe,
13 cuprinzând două sau mai multe enzime celulo litice, este capabilă să crească pe materie
vegetală fără o tratare prealabilă și este capabilă să utilizeze material lignocelulitic ca singură
15 sursă de carbon.

17 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția o reprezintă izolarea unei tulpini bacte-
riene capabilă să utilizeze ca sursă de carbon, celuloza și xilanul și totodată să fie compa-
tibilă cu bacterii lactice în vederea realizării de biopreparate destinate însilozării plantelor
19 furajere.

21 În vederea rezolvării problemei tehnice, invenția descrie o tulpină de *Bacillus sp.* SZE
102A, izolată din siloz de iarbă fermentat, depozitată la National Collection of Agricultural and
Industrial Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) B 001437, utilizată în
23 procesul de însilozare a plantelor furajere.

În continuare, se prezintă în detaliu invenția:

25 **Faza 1. Izolarea și identificarea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZE 102A**

Izolarea tulpinii bacteriene s-a realizat din produs fermentat, siloz de iarbă pe mediu
27 nutritiv screening. Compoziția mediului de cultură este: gelatină: 2,0 g/l, celuloză 2,0 g/l,
sulfat de magneziu 0,25 g/l, fosfat dihidrogen de potasiu 0,5 g/l, roșu de Congo 0,2 g/l, agar
29 15,0 g/l, pH final $7,0 \pm 0,2$ la 25°C. 1 g siloz de iarbă a fost suspendat în 10 ml soluție
fiziologică 0,9% NaCl, din care au fost realizate diluții seriale zecimale și însămânțate pe
31 suprafața mediului nutritiv selectiv. Incubarea plăcilor a fost realizată la 28°C în condiții
aerobe.

Tabelul 2

Încadrarea taxonomică a tulpinii 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
SZE102A	858	GCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCACTAAAG GGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTA CGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTCGCT CCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGAC CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACAT CTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATCCACT CTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATG ACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAG ACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCCAAT AATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC GGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGT TAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTCGAACGGT ACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTACGATCCGA AAACCTTCATCACTCAGCGGGCGTTGCTCCGTCAGA CTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT CCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTG TGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGT CGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAAT GCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAG CCACCTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAAG CATCCGGTATTAGCCCCGTTTCCCGGAGTTATCCC AGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCC GTCCGCCGCTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCG GTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCA CGCCGCCAGCG	<i>Bacillus licheniformis</i> AE017333 99,65%

Conform rezultatelor, izolatul bacterian selectat a fost identificat genetic, respectiv clasificat genotipic prin amplificarea genei 16S rARN. Pentru izolarea ADN-ului bacterian s-a utilizat un kit de extracție (AccuPrep® Genomic DNA Extractinn Kit) și a fost realizat pe baza instrucțiunilor de utilizare marcate de producător. Amplificarea genei 16S ribozomal prin tehnica PCR s-a realizat cu 2 amorse special proiectate pentru organisme procariote: 27 f și 1492 r. Identificarea tulpinilor bacteriene a fost realizată pe baza secvențializării fragmentului 16S rADN (tabelul 2).

Faza 2. Determinarea utilizării diferitelor surse de carbon și sensibilitatea chimică

Caracterizarea fenotipică a tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZE 102A identificată a fost realizată cu ajutorul sistemului Biolog Microlog GenIII (tabelul 3). Această caracterizare ne dă informații despre utilizarea a 71 surse de C de către tulpina în discuție, respectiv conține 23 teste de sensibilitate chimică (pH, diferite concentrații de NaCl, antibiotice).

Tabelul 3

Rezultatele cele mai relevante a utilizării diferitelor substraturi și sensibilitate chimică

Substrat	<i>Bacillus sp.</i> SZE102A
Dextrină	+
D-Maltoză	+

RO 130921 B1

Tabelul 3 (continuare)

1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35

Substrat	<i>Bacillus sp.</i> SZE102A
D-Trehaloză	+
D-Celobioză	+
Gentiobioză	+
Sucroză	+
D-Turanoză	+
Stachyoză	+
pH 6	+
pH 5	+
D-Melibioză	+
β-Metil-D-Glucozidă	+
D-Salicină	+
N-Acetil-D-Glucozamină	+
N-Acetil-P-D-Manozamină	+
1% NaCl	+
4% NaCl	+
8% NaCl	+
α-D-Glucoză	+
D-Manoză	+
D-Fructoză	+
D-Galactoză	+
L-Ramnoză	+
Inozină	+
1% Lactat de sodiu	+
D-Sorbitol	+
D-Manitol	+
mio-Inozitol	+
Glicerol	+
D- Acid Aspartic	+
Gelatină	+
Glicil-L-Prolină	+
L-Alanină	+
L-Arginină	+
L-Acid Aspartic	+

Tabelul 3 (continuare)

Substrat	<i>Bacillus sp.</i> SZE102A	
L-Acid Glutamic	+	3
L-Histidină	+	
Acid Piroglutamic	+	5
L-Serină	+	
Guanidine HCl	+	7
Pectină	+	
D-Acid Galacturonic	+	9
D- Acid Gluconic	+	
D-Acid Glucuronic	+	11
Glucuronamidă	+	
Acid Mucic	+	13
D- Acid Saccharic	+	
D-Lactic Acid Methl Ester	+	15
Acid Citric	+	
α -Keto- Acid Glutaric	+	17
D- Acid Malic	+	
Acid Bromo-Succinic	+	19
Acid Nalidixic	+	
Telurit de potasiu	+	21
Tween 40	+	
Acid α -Hidroxi	+	23
Acid β -Hidroxi-D,L-Butiric	+	
Acid Acetoacetic	+	25
Acid Acetic	+	
Acid Formic	+	27
Aztreonam	+	
Butirat de sodiu	+	29

Faza 3. Determinarea utilizării celulozei și xilanului ca substrat

Tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZE 102A a fost testată în vederea determinării utilizării carbohidraților structurali: celuloză și xilan. Pentru creșterea tulpinii bacteriene, a fost folosit mediu lichid BHM conținând ca singură sursă de carbon celuloza/xilanul. Mediul lichid BHM a conținut sulfat de magneziu 0,2 g/l, clorură de calciu 0,02 g/l, potasiu dihidrogen fosfat 1,0 g/l, nitrat de amoniu 1,0 g/l și clorură de fier 0,05 g/l. Acest mediu minimal a conținut celuloză/xilan în cantitate de 5 g/l. Mediile nutritive au fost inoculate cu culturi overnight realizate în mediu Nutrient. După inoculare, vasele Erlenmeyer au fost incubate timp de

RO 130921 B1

1 7 zile, la 28°C și 150 rpm. Probe pentru determinarea cantității carbohidraților reducători, au
fost luate în zilele 3, 5 și 7. Pentru obținerea de supernatant, probele au fost centrifugate și
3 analizate cu metoda Miller (1966).

5 Tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZE 102A este capabilă să crească și să utilizeze și
celuloza și xilanul ca sursă de carbon (vezi tabelul 4).

7 Tabelul 4

Determinarea cantității de zaharuri reducătoare prin metoda DNSA

Variația OD540/metoda DNSA			
Tulpina <i>Bacillus sp.</i> SZE 102A	3 zile	5 zile	7 zile
Xilan	0	0,1502	0,2774
Celluloză	0	0,0073	0

Faza 4. Determinarea compatibilității cu bacterii lactice

15 Compatibilitatea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZE 102A cu tulpini bacteriene lactice
a fost testată în vederea aplicabilității în consorții comune ca biopreparate microbiene pentru
17 furaje fermentate. Tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZE 102A s-a dovedit a fi compatibilă cu
14 tulpini bacteriene lactice, din totalul de 26 tulpini testate din genul *Lactobacillus sp.*,
19 *Enterococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Weissella sp.* (tabelul 5).

21 Tabelul 5

Compatibilitatea tulpinii *Bacillus sp.* SZE 102A cu tulpini de bacterii lactice

Tulpini bacteriene lactice	<i>Bacillus sp.</i> SZE102A
<i>Lactobacillus pentosus</i> C11	+
<i>Lactobacillus plantarum subsp.</i> A5	+
<i>Lactobacillus pentosus</i> A 7	+
<i>Enterococcus faecalis</i> B3	+
<i>Lactobacillus pentosus</i> C10	+
<i>Lactobacillus pentosus</i> C2	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> A1	-
<i>Lactobacillus pentosus</i> C15	-
<i>Weissella paramesenteroides</i> Luc 2	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> Luc 1	-
<i>Enterococcus faecalis</i> Szen 1	+
<i>Leuconostoc lactis</i> N19	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> C5	-
<i>Enterococcus faecalis</i> N21	+
<i>Lactobacillus paracases</i> N16	-
<i>Lactobacillus pentosus</i> N3	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> C6	+

Tabelul 5 (continuare)

Tulpini bacteriene lactice	<i>Bacillus sp.</i> SZE102A
<i>Lactobacillus acidophilus</i> H9	+
<i>Pediococcus parvulus</i> H17	-
<i>Lactobacillus buhneri</i> H1	-
<i>Lactobacillus brevis</i> H15	-
<i>Weissella paramesenteroides</i> Szen ana 2	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> Luc ana 2	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. Szen 1 ana	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> Luc ana 1	+

Faza 5. Creșterea tulpinii bacteriene pe biomasă vegetală

Creșterea tulpinii bacteriene a fost testată pe mediu lichid BHM, conținând ca singura sursă de carbon biomasă vegetală: iarbă și lucernă. Mediul lichid BHM a conținut sulfat de magneziu 0,2 g/l, clorură de calciu 0,02 g/l, potasiu dihidrogen fosfat 1,0 g/l, nitrat de amoniu 1,0 g/l și clorură de fier 0,05 g/l. Acest mediu minimal a conținut biomasă vegetală (iarbă/lucernă) într-o cantitate de 37,8 g/l. Din culturile bacteriene incubate pe mediu lichid Nutrient la 28°C, timp de 24 h, a fost realizată suspensia de bază. Mediul a fost inoculat cu suspensie bacteriană într-un vas Erlenmeyer de 100 ml care a conținut 20 ml de mediu lichid BHM conținând biomasă vegetală. Inocularea a fost efectuată cu o cantitate de 0,4 ml suspensie bacteriană ($OD_{600} = 0$), suspensia bacteriană fiind adăugată într-o cantitate de 2%. Mediul astfel pregătit a fost incubat la 28°C, timp de 24 h la 145 rpm. După 12, 24, 36 și 48 h, probe de câte 1 ml de cultură bacteriană au fost prelevate pentru determinarea numărului unităților formatoare de coloni, prin realizarea unor serii de diluții decimale și inocularea acestora pe mediu agarizat Nutrient. Plăcile Petri au fost cultivate la 28°C timp de 24 h, în vederea stabilirii numărului celulelor viabile.

Tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZE 102A, NCAIMP(B)001437 ajunge, după 48 h, la o valoare de $6,0 \cdot 10^7$ ufc/ml în mediu lichid BHM conținând iarbă, iar în cazul mediu lichid BHM conținând lucernă ajunge la o valoare de $8,06 \cdot 10^7$ ufc/ml (vezi tabelul 6).

Tabelul 6

Creșterea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZE 102A pe mediu BHM cu biomasă vegetală

Perioada de incubare	CFU/ml		
	24 h	36 h	48 h
Mediu BHM cu iarbă	$0,29 \cdot 10^7$	$4,26 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$
Mediu BHM cu lucernă	$0,1 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^7$	$8,06 \cdot 10^7$

Faza 6. Creșterea tulpinii bacteriene pe mediu lichid industrial

Mediul lichid industrial a conținut 22,5 g/l faină de soia, 1,25 g/l K_2HPO_4 și 1,25 g/L zahăr. Din culturile bacteriene incubate pe mediu lichid Nutrient la 28°C, timp de 24 h, a fost realizată suspensia de bază. Mediul industrial a fost inoculat cu suspensie bacteriană într-un vas Erlenmeyer de 100 ml care a conținut 20 ml de mediu lichid industrial. Inocularea a fost efectuată cu o cantitate de 0,2 ml suspensie bacteriană ($OD_{600} = 1$), suspensia bacteriană

RO 130921 B1

1 fiind adăugată într-o cantitate de 1%. Mediul astfel pregătit a fost incubat la 28°C, timp de
24 h la 145 rpm. După 12, 24, 36 și 48 h, probe de câte 1 ml de cultură bacteriană au fost
3 prelevate pentru determinarea numărului unităților formatoare de coloni, prin realizarea unor
serii de diluții decimale și inocularea acestora pe mediu agarizat Nutrient. Plăcile Petri au fost
5 cultivate la 28°C timp de 24 h, în vederea stabilirii numărului celulelor viabile.

7 Tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZE 102A, NCAIMP(B)001437 ajunge după 48 h la
o valoare de $9,26 \cdot 10^7$ ufc/ml în mediu lichid industrial (vezi tabelul 7).

9 Tabelul 7

Creșterea tulpinii bacteriene Bacillus sp. SZE 102A pe mediu industrial

	CFU/ml			
Perioada de incubare	12 h	24 h	36 h	48 h
<i>Bacillus sp.</i> SZE 102 A	$1,73 \cdot 10^7$	$3,63 \cdot 10^7$	$8,85 \cdot 10^7$	$9,26 \cdot 10^7$

15 Prin realizarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- 17 - promovarea procesului de însilozare, tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZE 102A
având capacitatea de a degrada polizaharide structurale vegetale;
- 18 - creșterea cantității de carbohidrați fermentescibili în siloz;
- 19 - utilizarea tulpinii în agricultura durabilă.

RO 130921 B1

Revendicare

1

Tulpină de *Bacillus sp.* SZE 102A, izolată din siloz de iarbă fermentat, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) B 001437, utilizată în procesul de însilozare a plantelor furajere.

3

5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 551/2019