



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00439

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

(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;
• 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, SM, RO;
• FEJER KIRALY GERGELY, NR. 701,
CIUMANI, SM, RO;
• KONCY MIHALY, STR. OITUZ NR. 8,
44/A/6, TÂRGU SECUIESC, CV, RO;
• MATHE LORAND, NR. 1054,
SÂNDOMINIC, SM, RO;
• DOBRI EMOKE, STR. PRINCIPALĂ
NR. 619, SATUL TURIA, CV, RO;
• BECZE ANNAMARIAL,
STR. PICTOR NAGY ISTVAN 8/A/20,
MIERCUREA CIUC, MH, RO

(54) **PROCEDEU DE IZOLARE ȘI CARACTERIZARE A TULPINII
BACTERIENE BACILLUS SP. SZE 102A CU ROL ÎN
PROMOVAREA PROCESULUI DE ÎNSILOZARE A
PLANTELOR FURAJERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei tulpini de *Bacillus sp.* utilizată pentru îmbunătățirea însilozării furajelor. Procedeu conform invenției constă în izolarea din probe de siloz de iarbă rezultat prin fermentare spontană, tulpina bacteriană izolată fiind depusă cu număr de înregistrare NCAIM (P) B 001437,

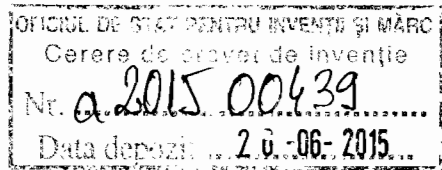
Bacillus sp. SZE 102A, fiind capabilă de a utiliza celuloza și xiloza ca sursă de carbon, eliminând carbohidrații reducători, și de a crește pe medii nutritive minerale, conținând biomasă vegetală.

Revendicări: 1

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).



7B



**PROCEDEU DE IZOLARE ȘI CARACTERIZARE A TULPINII BACTERIENE
BACILLUS SP. SZE102A CU ROL ÎN PROMOVAREA PROCESULUI DE ÎNSILOZARE
A PLANTELOR FURAJERE**

Prezenta invenție se referă la un procedeu de izolare și caracterizare a unei tulpini de *Bacillus sp. SZE102A*, număr de depozit NCAIMP(B)001437 care poate fi utilizată ca tulpină benefică în procesul însilozării având capacitatea de a degrada polisacaride structurale vegetale.

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

Microorganismele aerobe și anaerobe folosesc diferite strategii în degradarea materialului lignocelulitic. Fungii anaerobi secretă enzime cu activitate celulolitică diferită, iar bacteriile anaerobe încorporează celuloza într-o structură legată de suprafața celulei denumită celulosomă (Miller și Blum, 2010). Datorită acestor structuri, microorganismele sunt capabile să crească concentrația efectivă a enzimelor celulolitice pe suprafața celulară, și să îmbunătățească activitatea enzimatică datorită funcționării sinergice a acestora (Bayer și colab., 1998).

Datorită orientării mai pronunțate spre sursele regenerabile de energie, a crescut interesul pentru microorganisme care sunt capabile să descompună celuloza. Scopul cercetărilor a devenit găsirea și caracterizarea unor tulpini celulolitice cu proprietatea de degradare mai eficientă. Speciile de bacterii celulolitice sunt frecvente în diferite medii, cum ar fi compostul, solul, în ape reziduale, în intestin și în fecalele animalelor. În Tabelul 1 sunt enumerate microorganisme celulolitice cunoscute și proveniența acestora.

Tabel 1. Microorganisme celulolitice (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 rizozfera 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 fermentans</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
<i>Cellulomonas uda CB4</i>	+	facultativ anaerob	ape uzate din fabrică 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 polisaharidelor structurale. Brevetul EP 0369198 B1 descrie un procedeu de coservare a plantelor furajere prin utilizarea unor enzime celuloolitice (celulaze și xilanaze), alți aditivi ca acizi organici respectiv o tulpină bacteriană lactică (*Lactobacillus plantarum*). Acest brevet descrie procedeul obținerii unei furaje fermentate cu valori nutriționale îmbunătățite și cu efecte benefice asupra sănătății animalelor. Brevetul EP2013096369 A1 prezintă un procedeu propus pentru creșterea digestivității materialului celulozic. După o pretratare fizico-chimică pentru tratarea microbiologică 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 B-50606, PTA-7543, PTA-7547) au fost

propuse. O tulpină bacteriană de *Bacillus subtilis* recombinantă este propus pentru tratarea materialului lignocelulozic în brevetul EP 2014078716 A1. Această bacterie prezintă pe suprafața celulară o structură denumită minicelulosomă (caracteristică a tulpinilor bacteriene anaerobe) cuprinzând două sau mai multe enzime celololitice, și este capabilă să crească pe materie vegetală fără o tratare prealabilă și este capabilă să utilizeze material lignocelulitic ca singură sursă de carbon.

Problema pe care o rezolva invenția este izolarea și caracterizarea unei tulpini celololitice de *Bacillus sp.* ca tulpină benefică cu rol în promovarea procesului de însilozare plantelor furajere.

Prin realizarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- se propune o nouă tulpină bacteriană *Bacillus sp. SZE102A* depozitată cu număr de depozit NCAIMP(B)001437 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, Ungaria
- această tulpină are efect benefic asupra promovării procesului de însilozare
- contribuie la îmbunătățirea însilozării furajelor având capacitatea de a degrada polisacaride structurale vegetale, și cauzează creșterea cantității de carbohidrați fermentescibile în siloz
- tulpina poate fi baza unui nou produs în agricultura durabilă care îmbunătățește calitățile nutritive ale furajelor
- tulpina bacteriană este ușor cultivată

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

Faza 1. Izolarea și identificarea tulpinii bacteriene *Bacillus sp. SZE102A*

Izolarea tulpinii bacteriene s-a realizat din produs fermentat, siloz de iarbă pe mediu nutritiv screening (compoziția exactă a mediului în gram/litru: gelatină: 2.0, celuloză 2.0, sulfat de magneziu 0.25, fosfat dihidrogen de potasiu 0.5, roșu de Congo 0.2, agar 15.0, pH final 7.0 +/- 0.2 la 25°C). 1 g siloz de iarbă a fost suspendată în 10 ml soluție fiziologică (0,9% NaCl) din care au fost realizați diluții seriale zecimale și însămânțate pe suprafața mediului nutritiv selectiv. Incubarea plăcilor fost realizată la 28°C în condiții aerobe.

Tabel2. Incadrarea 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	GCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAG CACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACAC TTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACT ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCC CACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTAC AGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGG TGTTCTCCACATCTCTACGCATTTAC CGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCT TCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAAT GACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTT TCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGC GCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGA CAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC TTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCC GCCCTATTCGAACGGTACTTGTCTTCC CTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAA ACCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCC GTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGAT TCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC GATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCAT CGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACC AACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATC TGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACCTTT TATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAA GCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCG GAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTT ACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCG CTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCG GTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCA CGCCGCCAGCG	<p><u>Bacillus licheniformis</u> AE017333 99.65%</p>

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 Extraction 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 a tulpinilor bacteriene a fost realizată pe baza secvențializării fragmentului 16S rADN (Tabel 2).

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

Caracterizarea fenotipică a tulpinii bacteriene *Bacillus sp. SZE102A* identificată a fost realizată cu ajutorul sistemului BiologMicrolog GenIII (Tabelul 3). Această caracterizare ne dă informații despre utilizarea a 71 surse de C de către tulpina utilizată respectiv conține 23 teste de sensibilitate chimică (pH, diferite concentrații de NaCl, antibiotice).

Tabel 3. Rezultatele cele mai relevante a utilizării diferitelor substraturi și sensibilitate chimică

Substrat	<i>Bacillus sp. SZE102A</i>
Dextrin	+
D-Maltose	+
D-Trehalose	+
D-Cellobiose	+
Gentiobiose	+
Sucrose	+
D-Turanose	+
Stachyose	+
pH 6	+
pH 5	+
D-Melibiose	+
β-Methyl-D-Glucoside	+
D-Salicin	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	+
1% NaCl	+
4% NaCl	+
8% NaCl	+
α-D-Glucose	+
D-Mannose	+
D-Fructose	+
D-Galactose	+
L-Rhamnose	+
Inosine	+
1% Sodium Lactate	+
D-Sorbitol	+
D-Mannitol	+
myo-Inositol	+
Glycerol	+
D-Aspartic Acid	+
Gelatin	+
Glycyl-L-Proline	+
L-Alanine	+
L-Arginine	+
L-Aspartic Acid	+
L-Glutamic Acid	+

L-Histidine	+
Pyroglutamic Acid	+
L-Serine	+
Guanidine HCl	+
Pectin	+
D-Galacturonic Acid	+
D-Gluconic Acid	+
D-Glucuronic Acid	+
Glucuronamide	+
Mucic Acid	+
D-Saccharic Acid	+
D-Lactic Acid Methyl Ester	+
Citric Acid	+
α-Keto-Glutaric Acid	+
D-Malic Acid	+
Bromo-Succinic Acid	+
Nalidixic Acid	+
Potassium Tellurite	+
Tween 40	+
α-Hydroxy-Acid	+
β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	+
Acetoacetic Acid	+
Acetic Acid	+
Formic Acid	+
Aztreonam	+
Sodium Butyrate	+

Faza 3. Determinarea utilizării celulozei și xilanului ca substrat

Tulpina bacteriană *Bacillus sp. SZE102A* a fost testată în vederea determinării utilizării carbohidraților structurali (celuloză, xilan). Pentru creșterea tulpinii bacteriene a fost folosit mediu lichid BHM conținând ca singura sursă de carbon celuloză/xilan. 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 în realizate în mediu Nutrient. După inoculare vasele Erlenmeyer au fost incubate timp de 7 zile 28°C-ra, 150 rpm. Probe pentru determinarea cantității carbohidraților reducătoare au fost luate în ziua 3, 5 și 7. Pentru obținerea de supernatant probele au fost centrifugate și analizate cu metoda Miller (1966).

Tulpina bacteriană *Bacillus sp. SZE102A* este capabilă să crească și să utilizeze și celuloza și xilanul ca sursă de carbon (vezi. Tabel 4.).

Tabel 4. Determinarea cantității de zaharuri reducătoare prin metoda DNSA

Variația OD540/metoda DNSA			
Tulpina <i>Bacillus sp. SZE102A</i>	3 zile	5 zile	7 zile
xilan	0	0.1502	0.2774
celluloză	0	0.0073	0

Faza 4. Determinarea compatibilității cu bacterii lactice

Compatibilitatea tulpinii bacteriene *Bacillus sp. SZE102A* cu tulpini bacteriene lactice a fost testată în vederea aplicabilității în consorții comune ca biopreparate microbiene pentru furaje fermentate. Tulpina bacteriană *Bacillus sp. SZE102A*s-a dovedit a fi compatibilă cu 14 tulpini bacteriene lactice (din totalul de 26 tulpini testate) din genul *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Weissella sp.* (Tabel 5.).

Tabel 5. Compatibilitatea tulpinii *Bacillus sp. SZE102A* cu tulpini de bacterii lactice

Tulpini bacteriene lactice	<i>Bacillus sp. SZE 102A</i>
<i>Lactobacillus pentosus C11</i>	+
<i>Lactobacillus plantarum subsp. A5</i>	+
<i>Lactobacillus pentosus A7</i>	+
<i>Enterococcus faecalis B3</i>	+
<i>Lactobacillus pentosus C10</i>	+
<i>Lactobacillus pentosus C2</i>	+
<i>Lactobacillus plantarum A1</i>	-
<i>Lactobacillus pentosus C15</i>	-
<i>Weissella paramesenteroides Luc 2</i>	+
<i>Pediococcus pentosaceus Luc 1</i>	-
<i>Enterococcus faecalis Szen 1</i>	+
<i>Leuconostoc lactis N19</i>	-
<i>Lactobacillus plantarum C5</i>	-
<i>Enterococcus faecalis N21</i>	+
<i>Lactobacillus paracases N16</i>	-
<i>Lactobacillus pentosus N3</i>	-
<i>Lactobacillus plantarum C6</i>	+
<i>Lactobacillus acidophilus H9</i>	+
<i>Pediococcus parvulus H17</i>	-
<i>Lactobacillus buhneri H1</i>	-
<i>Lactobacillus brevis H15</i>	-
<i>Weissella paramesenteroides Szen ana 2</i>	+
<i>Pediococcus pentosaceus Luc ana2</i>	+

<i>Lactobacillus plantarum subsp. Szen 1 ana</i>	-
<i>Pediococcus pentosaceus Luc ana 1</i>	+

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 de ore, 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 ($OD_{600}=1$), suspensia bacteriană fiind adăugată într-o cantitate de 2%. Mediul astfel pregătit a fost incubat la 28°C, timp de 24 de ore la 145 rpm. După 12, 24, 36 și 48 de ore, 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 ore, în vederea stabilirii numărului celulelor viabile.

Tulpina bacteriană *Bacillus sp. 102ANCAIMP(B)001437* ajunge la o valoare de $6.0 \cdot 10^7$ UFC/mL în mediu lichid BHM conținând iarbă după 48 de ore, iar în cazul mediu lichid BHM conținând lucernă ajunge la o valoare de $8.06 \cdot 10^7$ UFC/mL după 48 de ore (vezi Tabel 6).

Tabel 6. Creșterea tulpinii bacteriene *Bacillus sp. SZE102A* 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 făină 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 de ore, 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 efectuat cu o cantitate de 0,2 ml suspensie bacteriană ($OD_{600}=1$), suspensia bacteriană fiind adăugat într-o cantitate de 1%. Mediul astfel pregătit a fost incubat la 28°C, timp de 24 de ore la 145 rpm. După 12, 24, 36 și 48 de ore, 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 ore, în vederea stabilirii numărului celulelor viabile.

Tulpina bacteriană *Bacillus sp. SZE102ANCAIMP(B)001437* ajunge la o valoare de $9.26 * 10^7$ UFC/mL în mediu lichid industrial după 48 de ore (vezi Tabel 7).

Tabel 7. Creșterea tulpinii bacteriene *Bacillus sp. SZE102A* pe mediu industrial

CFU/ml				
Perioada de incubare	12 h	24 h	36 h	48 h
<i>Bacillus sp. SZE 102 A</i>	$1.73 * 10^7$	$3.63 * 10^7$	$8.85 * 10^7$	$9.26 * 10^7$

REVENDICARE

1. Tulpina *Bacillus sp SZE102A*, depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu număr de înregistrare **NCAIMP(B)001437**, bacterie autohtonă izolat din probe siloz de iarbă obținut prin fermentare spontană, este o tulpină capabilă să degradeze polisacharide structurale vegetalecu o perspectivă pentru utilizare ca tulpină benefică, pentru promovarea însilozării plantelor furajere.

