



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00440**

(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;
• **KOVACS ERIKA**, NR.240, SÂNSIMION,
HR, RO;
• **ORBAN KALMAN CSONGOR**,
CART. FLORILOR, BL, C, SC. 2, AP. 6,
SOVATA, MS, 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;
• **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;
• **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;
• **FUNKENHAUSER BERNADETT**,
ALEEA CLĂBUCET NR. 11, 4/90,
SATU MARE, SM, 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;
WO 2014078716 A1

(54) **TULPINĂ DE BACILLUS SP. SZX102 UTILIZATĂ
ÎN PROCESUL DE ÎNSILOZARE A PLANTELOR FURAJERE**



RO 130922 B1

1 Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Bacillus sp.* SZX102, utilizabilă în procesul
de însilozare a plantelor furajere, având capacitatea de a degrada polisacharidele structurale
3 vegetale.

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

11 Microorganismele aerobe și anaerobe folosesc diferite strategii în degradarea mate-
rialului lignocelulitic. Fungii anaerobi secretă enzime cu activitate celololitică diferită, iar bac-
13 teriile anaerobe încorporează celulozele într-o structură legată de suprafața celulei, denumită
celulosomă (Miller și Blum, 2010). Datorită acestor structuri, microorganismele sunt capabile
15 să crească concentrația efectivă a enzimelor celololitice pe suprafața celulară și să
îmbunătățească activitatea enzimatică datorită funcționării sinergice a acestora (Bayer și
17 colab., 1998). Specii bacteriene celololitice sunt cunoscute din genurile *Acinetobacter*,
Bacillus, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* și *Rhodococcus*.

19 Datorită orientării mai pronunțate spre sursele regenerabile de energie, a crescut
interesul pentru microorganisme care sunt capabile să descompună celuloza, iar scopul
21 cercetărilor a devenit găsirea și caracterizarea unor tulpini celololitice cu proprietatea de
degradare mai eficientă. Speciile de bacterii celololitice sunt frecvente în diferite medii, cum
23 ar fi compostul, solul, în ape reziduale, în intestin și în fecalele animalelor.

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

Brevetul **RO 72540 B1** descrie o tulpină mutantă prototrofă de *Bacillus subtilis*
27 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
29 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,
31 orzul întreg, orezul întreg, grâul sau porumbul. Cele două tulpini descrise în acest document
prezintă o puternică activitate celulazică, au un efect excelent în scăderea pH-ului și au fost
33 izolate din alimente și sol.

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

Brevetul **EP 0369198 B1** descrie un procedeu de obținere a unor furaje fermentate
41 cu valori nutriționale îmbunătățite și cu efecte benefice asupra sănătății animalelor, prin
utilizarea unor enzime celololitice (celuloze și xilanaze), alți aditivi ca acizi organici și a unei
43 tulpini bacteriene lactice de *Lactobacillus plantarum*.

Cererea de brevet **WO 2013096369 A1** prezintă o metodă pentru creșterea
45 digestibilității materialului celulozic. Într-un exemplu de realizarea a invenției, se menționează
utilizarea următoarelor tulpini de *Bacillus sp.*: ATCC 700385, NRRL B-50136, NRRL B-
47 50622, NRRL B-50623, NRRL B-50605, NRRL B-50621, NRRL B-50015, NRRL B-50607,
NRRL B-50606, PTA-7543, PTA-7547, pentru tratarea materialului lignocelulozic.

RO 130922 B1

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este reprezentată de izolarea unei tulpini bacteriene compatibilă cu bacterii lactice în vederea realizării de biopreparate destinate însilozării plantelor furajere. 1
3

În vederea rezolvării problemei tehnice, invenția descrie o tulpină bacteriană de *Bacillus sp.* SZX102, izolată din siloz de iarbă fermentat, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) B 001438, utilizată în procesul de însilozare a plantelor furajere. 5
7

În continuare, se prezintă în detaliu invenția.

Faza 1. Izolarea și identificarea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZX102 9

Izolarea tulpinii bacteriene s-a realizat din produs fermentat, siloz de iarbă pe mediu 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 15,0 g/l, pH final 7,0 ± 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 suprafața mediului nutritiv selectiv. Incubarea plăcilor a fost realizată la 28°C în condiții aerobe. 11
13
15

Conform rezultatelor, izolatul bacterian 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 tulpinilor bacteriene a fost realizată pe baza secvențializării fragmentului 16S rADN (tabelul 1). 17
19
21
23

Tabelul 1 25

Încadrarea taxonomică a tulpinii bacteriene pe baza secvențelor 16S rADN

Tulpina	Lungimea secvenței 16SrADN (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
SZX102	853	CGGAGTGCCTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGGC	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> ABQLO1000001 99,88%
		GGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCG	
		TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACG	
		CTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGC	
		CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTT	
		CACCGCTACAGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCAC	
		TCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAG	
		CCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGC	
		GAGCCCTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCC	
		ACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC	
		CGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCC	
		TATTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCT	
		TTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCAGCGCGGTTGC	
		TCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACT	
		GCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCC	
		CAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCAT	
CGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAA			
TGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCC			
ACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATC			
CGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTT			
ACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCC			
GCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCG			
ACTTGCATGTATTAGGCACG CCGCCA			

RO 130922 B1

1 Faza 2. *Determinarea utilizării diferitelor surse de carbon și sensibilitatea chimică*
2 Caracterizarea fenotipică a tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZX102 identificată a fost
3 realizată cu ajutorul sistemului Biolog Microlog GenIII (tabelul 2). Această caracterizare ne
4 dă informații despre utilizarea a 71 surse de C de către tulpina utilizată, respectiv conține 23
5 teste de sensibilitate chimică (pH, diferite concentrații de NaCl, antibiotice).

7 *Tabelul 2*

8 *Rezultatele cele mai relevante ale utilizării diferitelor substraturi și sensibilitate chimică*

9	Substrat	<i>Bacillus sp.</i> SZX102
	Dextrin	+
11	D-Maltose	+
	D-Trehalose	+
13	D-Cellobiose	+
	Gentiobiose	+
15	Sucrose	+
	D-Turanose	+
17	Stachyose	+
	pH 6	+
19	pH 5	+
	D-Raffinose	+
21	D-Melibiose	+
	β -Methyl-D-Glucoside	+
23	D-Salicin	+
	N-Acetyl-D-Glucosamine	+
25	N-Acetyl- β -D-Mannosamine	+
	1% NaCl	+
27	4% NaCl	+
	8% NaCl	+
29	α -D-Glucose	+
	D-Mannose	+
31	D-Fructose	+
	L-Rhamnose	+
33	1% Sodium Lactate	+
	D-Sorbitol	+
35	D-Mannitol	+
	myo-Inositol	+
37	Glycerol	+

Tabelul 2 (continuare)

Substrat	<i>Bacillus sp. SZX102</i>
Gelatin	+
L-Alanine	+
L-Arginine	+
L-Aspartic Acid	+
L-Glutamic Acid	+
L-Histidine	+
Pyroglutamic Acid	+
Pectin	+
D-GalacturonicAcid	+
D-Gluconic Acid	+
D-GlucuronicAcid	+
Mucic Acid	+
D-Saccharic Acid	+
Methyl Pyruvate	+
L-Lactic Acid	+
α -Keto-Glutaric Acid	+
L-MalicAcid	+
Lithium Chloride	+
Potassium Tellurite	+
Acetic Acid	+

Faza 3. Determinarea utilizării celulozei și xilanului ca substrat

Tulpina bacteriană *Bacillus sp. SZX102* a fost testată în vederea determinării utilizării carbohidraților structurali: celuloză și xilan. Pentru creșterea tulpinii bacteriene, a fost folosit mediul 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 7 zile la 28°C și 150 rpm. Probele pentru determinarea cantității carbohidraților reducătoare au fost luate în zilele 3, 5 și 7. Pentru obținerea de supernatant, probele au fost centrifugate și analizate cu metoda Miller (1966).

Tulpina bacteriană *Bacillus sp. SZX102* este capabilă să crească și să utilizeze și celuloza și xilanul ca sursă de carbon (vezi tabelul 3).

Determinarea cantității de zaharuri reducătoare prin metoda DNSA

Variația OD ₅₄₀			
Tulpina <i>Bacillus sp.</i> SZX102	3 zile	5 zile	7 zile
Xilan	0	0,0359	0,3933
Celuloză	0	0,0332	0

Faza 4. Determinarea compatibilității cu tulpinile de bacterii lactice

Compatibilitatea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZX102 cu tulpini bacteriene lactice a fost testată în vederea aplicabilității în consorții comune ca biopreparate microbiene pentru furaje fermentate. Tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZX102 s-a dovedit a fi compatibilă cu toate tulpinile bacteriene lactice testate (26 tulpini) din genul *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Weissella sp.* (tabelul 4).

Compatibilitatea tulpinii *Bacillus sp.* SZX102 cu tulpini de bacterii lactice

Tulpini bacteriene lactice	<i>Bacillus sp.</i> SX 102
<i>Lactobacillus pentosus</i> C11	+
<i>Lactobacillus plantarum subsp.</i> A5	+
<i>Lactobacillus pentosus</i> A7	+
<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>Weissellaparamesenteroides</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	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> H9	+
<i>Pediococcus parvulus</i> H17	+
<i>Lactobacillus buhneri</i> H1	+

Tabelul 4 (continuare)

Tulpini bacteriene lactice	<i>Bacillus sp.</i> SX 102
<i>Lactobacillus brevis</i> H15	+
<i>Weissellaparamesenteroides</i> Szenana 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 singură 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 ($OD_{600} = 1$), 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 colonii, 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.* SZX102 NCAIMP(B)001438 ajunge, după 48 h, la o valoare de $4,26 \cdot 10^7$ ufc/ml în mediu lichid BHM conținând iarbă, iar în cazul mediului lichid BHM conținând lucernă, ajunge la o valoare de $7,96 \cdot 10^7$ ufc/mL (tabelul 5).

Tabelul 5

Creșterea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZX102 pe mediu BHM cu biomasă vegetală

Perioada de incubare	CFU/ml		
	24 h	36 h	48 h
Mediu BHM cu iarbă	$0,1 \cdot 10^7$	$4,46 \cdot 10^7$	$4,26 \cdot 10^7$
Mediu BHM cu lucernă	$0,1 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^7$	$7,96 \cdot 10^7$

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 fiind adăugată într-o cantitate de 1%. Mediul astfel pregătit a fost incubat la 28°C, timp de

RO 130922 B1

1 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 colonii, prin realizarea unor
3 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.

5 Tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZX102 NCATMP(B)001438 ajunge după 48 h la o
valoare de $12,74 \cdot 10^7$ ufc/mL în mediu lichid industrial (tabelul 6).

7

Tabelul 6

9 Creșterea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.* SZX102 pe mediu industrial

CFU/ml				
Perioada de incubare	12 h	24 h	36 h	48 h
<i>Bacillus sp.</i> SZX102	$6,03 \cdot 10^7$	$18,52 \cdot 10^7$	$14,36 \cdot 10^7$	$12,74 \cdot 10^7$

13

Prin realizarea invenției se obțin următoarele avantaje:

15 - promovarea procesului de însilozare, tulpina bacteriană *Bacillus sp.* SZX102 având
capacitatea de a degrada polizaharide structurale vegetale;

17 - creșterea cantității de carbohidrați fermentescibili în siloz;

- utilizarea tulpinii în agricultura durabilă.

RO 130922 B1

Revendicare

1

Tulpină de *Bacillus sp.* SZX102, izolată din siloz de iarbă fermentat, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu număr de înregistrare NCAIMP(B)001438, 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. 552/2019