



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00440

(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;
• 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 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;
• FUNKENHAUSER BERNADETT,
ALEEA CLĂBUCET NR. 11, 4/90,
SATU MARE, SM, 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.* SZX102 CU ROL ÎN
PROMOVAREA PROCESULUI DE ÎNSILOZARE A
PLANTELOR FURAJERE**

(57) Rezumat:

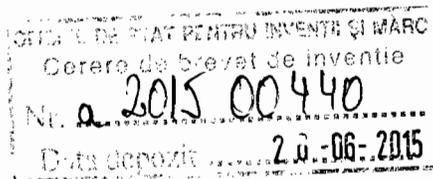
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei tulpini bacteriene *Bacillus sp.* cu rol în promovarea procesului de însilozare a plantelor furajere. Procedeu conform invenției constă în izolarea tulpinii din probe siloz de iarbă rezultată prin fermentare spontană, tulpina bacteriană izolată fiind depusă cu număr de

înregistrare NCAIM (P) B 001438, *Bacillus sp.* SZX 102, fiind capabilă să degradeze polizaharide structurale vegetale, pentru îmbunătățirea însilozării furajelor.

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).





PROCEDEU DE IZOLARE ȘI CARACTERIZARE A TULPINII BACTERIENE *BACILLUS SP. SZX102* 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. SZX102*, număr de depozit NCAIMP(B)001438 care poate fi utilizată ca tulpină benefică în procesul însilozării având capacitatea de a degrada polisacharide 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 celulazele 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). Specii bacteriene celulolitice sunt cunoscute din genurile *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* și *Rhodococcus*.

Datorită orientării mai pronunțate spre sursele regenerabile de energie, a crescut interesul pentru microorganisme care sunt capabile să descompună celuloza, iar 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.

Se cunosc mai multe proceduri de însilozare unde se aplică ca aditivi biologici enzime celuloitice și/sau bacterii celuloitice cu rol în degradarea polisaharidelor structurale. Brevetul EP 0369198 B1 descrie un procedeu de coservare a plantelor furajere prin utilizarea unor enzime celuloitice (celulaze și xilanaze), alți aditivi ca acizi organici respectiv o tulpină bacteriană lactică. 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 celuloitice, 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 celuloitice 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. SZX102* depozitată cu număr de depozit NCAIMP(B)001438 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 polisaharide 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):

Faza1. Izolarea și identificarea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.SZX102*

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 in condiții aerobe.

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 tehnicaPCR 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).

Tabell1. 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
---------	--	--	--

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
SZX102	853	CGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGC ACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACT TAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACT ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCC CACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTAC AGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGG TGTTCTCCACATCTCTACGCATTTAC CGCTACACGTGGAATCCACTCTCCTCT TCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAAT GACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTT TCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGC GAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGA CAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC TTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACC GCCCTATTCGAACGGTACTTGTCTTCC CTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAA ACCTTCATCACTCACGGCGTTGCTCC GTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGAT TCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC GATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCAT CGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACC AACTAGCTAATGCGCCGCGGTCCATC TGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTT ATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAC CATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGG AGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTA CCCACGTGTTACTACCCGTCGCGCGCT AACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGT CCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACG CCGCCA	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> ABQLO100001 99.88%

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

Caracterizarea fenotipică a tulpinii bacteriene *Bacillus sp.SZX102* identificată a fost realizată cu ajutorul sistemului BiologMicrolog GenIII (Tabelul 2). 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 2. Rezultatele cele mai relevante a utilizării diferitelor substraturi și sensibilitate chimică

Substrat	<i>Bacillus sp.SZX102</i>
Dextrin	+
D-Maltose	+
D-Trehalose	+
D-Cellobiose	+
Gentiobiose	+
Sucrose	+
D-Turanose	+
Stachyose	+
pH 6	+
pH 5	+
D-Raffinose	+
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	+
L-Rhamnose	+
1% Sodium Lactate	+
D-Sorbitol	+
D-Mannitol	+
myo-Inositol	+
Glycerol	+
Gelatin	+
L-Alanine	+
L-Arginine	+
L-Aspartic Acid	+
L-Glutamic Acid	+
L-Histidine	+
Pyroglutamic Acid	+
Pectin	+
D-Galacturonic Acid	+
D-Gluconic Acid	+
D-Glucuronic Acid	+
Mucic Acid	+
D-Saccharic Acid	+
Methyl Pyruvate	+
L-Lactic Acid	+
α -Keto-Glutaric Acid	+
L-Malic Acid	+
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, 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 la 28°C și 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. SZX102* este capabilă să crească și să utilizeze și celuloza și xilanul ca sursă de carbon (vezi. Tabel 3.)

Tabel 3. Determinarea cantității de zaharuri reducătoare prin metoda DNSA

Variația OD ₅₄₀			
Tulpina <i>Bacillus sp. SZX102</i>	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.*, *Pedococcus sp.*, *Weisella sp.* (Tabel 4.).

Tabel 4. Compatibilitatea tulpinii *Bacillus sp. SZX102* cu tulpini de bacterii lactice

Tulpini bacteriene lactice	<i>Bacillus sp. SX 102</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>Weissellaparamesenteroides Luc 2</i>	+
<i>Pediococcuspentosaceus Luc 1</i>	+
<i>Enterococcus faecalisSzen 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>Pediococcusparvulus H17</i>	+
<i>Lactobacillus buhneri H1</i>	+
<i>Lactobacillus brevis H15</i>	+
<i>WeissellaparamesenteroidesSzenana 2</i>	+
<i>Pediococcuspentosaceus Luc ana2</i>	+
<i>Lactobacillus plantarum subsp. Szen 1 ana</i>	+
<i>Pediococcuspentosaceus 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 (OD₆₀₀=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 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 ore, în vederea stabilirii numărului celulelor viabile.

Tulpina bacteriană *Bacillus sp.SZX102*NCAIMP(B)001438 ajunge la o valoare de $4.26 * 10^7$ 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 $7.96 * 10^7$ UFC/mL după 48 de ore (vezi Tabel 5).

Tabel 5. Creșterea tulpinii bacteriene *Bacillus sp.SZX102* pe mediu BHM cu biomasă vegetală

CFU/ml			
Perioada de incubare	24 h	36 h	48 h
Mediu BHM cu iarbă	$0.1 * 10^7$	$4.46 * 10^7$	$4.26 * 10^7$
Mediu BHM cu lucernă	$0.1 * 10^7$	$3.6 * 10^7$	$7.96 * 10^7$

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 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 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.SZX102*NCAIMP(B)001438 ajunge la o valoare de $12.74 * 10^7$ UFC/mL în mediu lichid industrial după 48 de ore (vezi Tabel 7).

Tabel 7. 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. SX 102</i>	$6.03 * 10^7$	$18.52 * 10^7$	$14.36 * 10^7$	$12.74 * 10^7$

REVENDICARE

1. Tulpina *Bacillus sp.SZX102*, depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu număr de înregistrare **NCAIMP(B)001438**, bacterie autohtonă izolat din probe siloz de iarbă obținut prin fermentare spontană, este o tulpină capabilă să degradeze polisacharide structurale vegetale cu o perspectivă pentru utilizare ca tulpină benefică, pentru promovarea însilozării plantelor furajere.