



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00927

(22) Data de depozit: 27/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. 5/2017

(71) Solicitant:
• CORAX-BIONER CEU S.A.,
PIAȚA LIBERTĂȚII NR.1, ET.3, CAM.319,
MIERCUREA-CIUC, HR, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ORBAN KALMAN CSONGOR,
CART. FLORILOR, BL, C, SC. 2, AP. 6,
SOVATA, MS, RO;

• RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• MARA GYONGYVER, PIAȚA LIBERTĂȚII
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• MIKOSSY ILDIKO, BD. TIMIȘOAREI
NR. 38/19, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• DOSA ALMOS, NR. 14, BL. B. AP. 2,
SAT NEAUA, COMUNA NEAUA, HR, RO;
• BECZE ANNAMARIA,
STR. PICTOR NAGY ISTVAN 8/A/20,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LANYI SZABOLCS,
STR. MIHAI EMINESCU NR. 1, SC. A,
AP. 22, MIERCUREA CIUC, HR, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOPREPARAT
INOCULANT CU MICROORGANISME ÎNCAPSULATE
ÎNTR-O BIOMATRICE HIDROFILĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat pentru tratamentul plantelor de cultură. Procedeu conform invenției constă în încapsularea unor tulpini de microorganisme inoculante într-o biomatrice hidrofilă, produsă de tulpinile de micro-

organisme compatibile, de tip microorganisme producătoare de kefiran/lactobacili, cu care sunt co-cultivate respectivele microorganisme inoculante.

Revendicări: 1



PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOPREPARAT INOCULANT CU MICROORGANISME ÎNCAPSULATE ÎNTR-O BIOMATRICE HIDROFILĂ

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat inoculant, care include microorganisme încapsulate într-o biomatrice hidrofilă, destinate tratamentului plantelor de cultură, pentru protejarea, biostimularea sau biofertilizarea acestora și/sau a materialului vegetal, în scopul: (i) degradării lignocelulozei în componente mai simple, care pot fi procesate ulterior prin biorafinare în bio-combustibili, biosolvenți, biopolimeri sintetici, biostimulanți pentru plante; (ii) managementului durabil al resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; (iii) inoculării nutrețurilor însilozate în vederea fermentării controlate pentru creșterea valorii nutritive.

Sunt cunoscute diferite procedee de condiționare a microorganismele benefice, utilizate ca bio/agro-inoculant, în matrici hidrofile. Polimerii superadsorbanti au fost larg folosiți pentru condiționarea / traparea microorganismelor inoculante, poliacrilamida fiind printre primii astfel de polimeri utilizați (Domergues și Hoang, 1979, Appl. Environ. Microbiology 37, 779–781). În lucrarea citată autorii au demonstrat că rhizobiile cultivate pe medii lichide și condiționate prin închidere în gel de poliacrilamidă au aceeași eficacitate ca și cele adsorbite în turbă neagră. Producerea poliacrilamidei implică însă utilizarea unor monomeri neurotoxici și a unui personal înalt calificat, fapt care a limitat extinderea acestei soluții de condiționare.

În brevetul US 4975105 este descris un biopreparat pe baza microorganismelor inoculante din categoria ciupercilor de exomicoriză (*Suillus luteus*; *Pisolithus tinctorius*), în care respectivele microorganisme inoculante sunt incluse într-un polimer superadsorbant (poliacrilat și săruri de poliacrilat; co-polimeri de poliacrilat cu poliacrilamidă și/sau alcool polivinilic), care este gonflat în apă la de 300...500 ori greutatea inițială, și în care sunt apoi introduse rădăcinile plantelor tratate. Procedeu descris prin brevetul US4975105 este limitat numai la tratamentul arborilor și arbuștilor aflați în curs de transplantare la locul definitiv.

Brevetul RO 128586 se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat microbial inoculant care include următoarele etape: prepararea unui mediu de cultură lichid specific pentru tulpinile de microorganisme inoculante care urmează a fi

(co)cultivate; adăugarea la mediul de cultură lichid a unor granule de hidrogel - polimer hidrofil superadsorbant (copolimer poliacrilat - poliacrilamidă), în proporție de 1g polimer superadsorbant la 100...200 ml mediu de cultură; gonflarea hidrogelului - polimerului superadsorbant și scurgerea excesului de mediu de cultură; distribuirea a 200...250 ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 400...500 ml și sigilarea prin termosudare a pungii; sterilizarea la 121°C, timp de 20min a pungilor de polipropilenă cu mediu de cultură adsorbit în polimeri hidrofilii; inocularea fiecărei pungi prin injectarea aseptică cu 1,5...2ml de suspensie $10^6...10^8$ ufc/ml microorganisme inoculante; sigilarea în condiții aseptice a găurii rezultate la inoculare și incubarea timp de 3...7 zile la temperatura optimă de creștere a tulpinilor de microorganisme inoculante; reambalarea pungilor de polipropilenă, cu mediu de cultură adsorbit în polimeri superadsorbanti, pe care au crescut microorganisme inoculante, în pungi de polietilenă de dimensiuni mai mari, etichetarea și depozitarea timp de 2...12 luni în locuri ferite de umiditate, lumină și căldură excesivă. Procedul de obținere descris favorizează dezvoltarea tulpinilor cu creștere lentă și producerea masivă de exopolizaharid, formarea de consorții microbiene de consens și o supraviețuire pe termen lung a microorganismelor cultivate.

Brevetul RO 128586 prezintă un procedeu de obținere a biopreparatelor microbiene cu bacterii în stare de dormanță alcătuit din următoarele etape: realizarea unui mediu de cultură pe baza de ape glicerinoase cu următoarea compoziție 58 ... 62 părți ape glicerinoase 10% s.u., 1,4 ... 1,6 părți plasmolizat de drojdie, 0,14 ... 0,16 părți K_2HPO_4 ; 0,14 ... 0,16 părți $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,015 ... 0,025 părți $CaCl_2$; 0,02 ... 0,03 părți Zn:glicerol (1:4) și apă până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă; sterilizarea mediului de cultură la 121°C timp de 30 min.; răcirea la temperatura de regim specifică fiecărui microorganism și inocularea mediului de cultură; dezvoltarea culturii de bacterii timp de 72 ore la temperatura optimă a fiecărui microorganism, pe mediu aerat și agitat; recoltarea biomasei de bacterii prin centrifugare și reluarea biomasei într-un volum redus de supernatant, respectiv 1 parte de biomasă în 10 părți mediu de cultură epuizat separat ca supernatant prin centrifugare; amestecarea biomasei de bacterii cu hidrogel superadsorbant pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu în proporție de 1 parte de hidrogel la 100 părți suspensie; gonflarea timp de

30 min a hidrogelului în suspensia de bacterii; adăugarea peste amestecul de hidrogel gonflat – suspensie de bacterii a unei soluții de 1 M de trehaloză, 1 parte soluție de trehaloză la 19 ...19,5 părți suspensie bacteriană în amestec cu hidrogel; amestecarea energetică cu omogenizarea hidrogelului cu ajutorul unui turbomixer; uscarea prin pulverizare a amestecului bacterii (în mediu de cultură) la o temperatura de 120 ... 140°C intrare agent de uscare și 70 ... 75°C ieșire agent de uscare.

Dezavantajele procedeele care utilizează polimeri superadsorbanți sintetici sunt legate de biodegradabilitatea lor redusă, care poate genera probleme de mediu în condițiile unei utilizări semnificative. Au fost dezvoltate o serie de procedee care implică condiționarea microorganismelor inoculante în matrici hidrofile naturale. Brevetul US4818530 descrie un procedeu de realizare a granulelor de alginat de calciu care conțin spori de ciuperci antagoniste pentru fitopatogeni. Acest procedeu implică amestecarea sporilor de ciuperci antagoniste cu o soluție coloidală de alginat de sodiu, coacervarea picăturilor de amestec alginat - spori într-o soluție de clorură de calciu, urmată de recoltarea și uscarea granulelor. Procedeu are dezavantajul de a utiliza spori de ciuperci recoltate de pe un mediu agarizat, prețul de cost al agarului împiedicând ridicarea la scară. Acest procedeu a fost aplicat de închidere în gel de alginat de calciu a fost extins pentru bacteriile inoculante, cultivate pe medii lichide aerate și agitate (Bashan, 1986, Appl Environ Microbiol., 51, 1089-1098), și larg utilizat în domeniu (a se vedea de exemplu review-ul Schoebitz et al. 2013, Agron. Sustain. Develop., 33: 751-765). Dezavantajul acestui tip de procedee este determinat de faptul că nu se pot obține decât formulări solide, datorită granulării inițiale prin gelifiere ionotropă a alginatului în prezență de ioni de calciu, care generează un material solid la temperaturile uzuale.

S-a descris și procedee în care sunt utilizate diferite alte biomatrici hidrofile, cum sunt de ex. diferitele tipuri de făină de cereale sau rumegușul. Cererea de brevet EP 2735607 se referă la includerea unei tulpini de *Trichoderma harzianum* într-o matrice constituită din 70 părți rumeguș de lemn parțial hidrolizat, 10 părți făină, 4,8 părți esteri etilici ai acizilor grași, 4 părți alcool polivinilic, 3,5 părți lecitină, 0,75 părți săpun de potasiu, 0,45 părți glicerol, 0,4 părți trigliceride din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă. Brevetul KR 100914765 protejează condiționarea unor microorganisme care solubilizează fosforul anorganic din soluri pe argile, tărâțe de orez și amestec al

acestora. Brevetul AU2007203615 dezvăluie un inoculant pentru siloz care este realizat prin amestecarea unor lactobacili cu griș și mălai, amestecate în diferite proporții, grișul având particule cu dimensiuni care sunt ușor mai mici decât cele ale mălaiului.

Dezavantajul unor astfel de procedee este legat de variabilitatea ridicată a materialelor naturale folosite, care necesită un sistem riguros de asigurarea calității pentru o bună reproductibilitate a activității biologice a microorganismelor inoculante.

Brevetul JP 3328924 revendică un procedeu de încapsulare a microorganismelor simbiotice cu rădăcinile plantelor, care constă în cultivarea microorganismelor simbiotice benefice, ciuperci de micoriză sau rhizobii fixatoare de azot, împreună cu microorganismele care sintetizează biopolimeri, ca de ex. celuloză bacteriană sau curdlan, pe un mediu lichid, într-o singură etapă. Ca exemplificare de microorganisme producătoare de biopolimeri este prezentat *Gluconoacetobacter xylinum* ATCC 10245. Procedeu prezintă avantajul asigurării unei reproductibilități mai ridicate a biomatricei în care se face încapsularea microorganismelor. Dezavantajul este determinat de compatibilitatea redusă a microorganismelor co-cultivate în mediu lichid. Nu sunt descrise și/sau revendicate în cadrul acestui procedeu etape în care să se testeze compatibilitatea tulpinilor co-cultivate și/sau capacitatea acestora de a forma consorții de consens. Qin et al. 2014 (Carbohydr. Pol., 100: 40-45), atunci când au co-cultivat bacterii *G. xylinum* cu o tulpină recombinantă de *E.coli*, au testat în prealabil compatibilitatea acestora prin co-cultivare. Folosirea (nano)celulozei bacteriene ca matrice de condiționare determină formarea exclusivă de biopreparate solide, care sunt greu de reconstituit ca suspensie în mediu lichid datorită caracterului hidrocoloid extrem al nanocelulozei.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de încapsulare a tulpinilor de microorganisme inoculante, într-o biomatrice hidrofiliă, produsă de tulpinile de microorganisme compatibile, cu care respectivele microorganisme inoculante sunt co-cultivate.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie o etapă prin care sunt selectate, rapid și cu eficiență ridicată, tulpinile, de microorganisme inoculante și de microorganisme producătoare de kefirin, din care se constituie consorțiile de consens co-cultivate pentru încapsularea în biomatrice hidrofiliă a microorganismelor inoculante.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Selecția tulpinilor compatibile de microorganisme inoculante și de microorganisme producătoare de kefiran printr-o tehnică de screening de înalt randament;
- Verificarea capacității tulpinilor selectate de a forma consorții de consens, prin determinarea producerii de kefiran, menținerea caracteristicilor biologice ale microorganismelor inoculante și formarea de biofilme de către respectivele microorganisme inoculante, prin co-cultivare în condiții microaerofile, pe un mediu lichid, format din 2% glucoză, 2% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 2% triptonă, 0,2% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, și 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, cu un pH inițial de 5,5, distribuit câte 2,4 ml în plăci cu 12 godeuri;
- Co-cultivarea consorțiilor de microorganisme selectate pe un mediu lichid format din 2% lactoză, 2,5% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,02% Zn : glicerol (1:4) 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, aerat până la 10% saturație de oxigen, timp de 96 ore la 28°C și pH 6.0;
- Separarea granulelor de kefiran din mediul lichid, omogenizarea acestora la un turbo-mixer în prezență de 0,1M trehaloză și 0,02 M betaină, și uscarea prin pulverizare în condiții blânde, la o temperatura de 120 ... 140°C intrare agent de uscare și 70 ... 75°C ieșire agent de uscare.

Tehnica de screening de înalt randament, pentru selecția tulpinilor compatibile de microorganisme inoculante și de microorganisme producătoare de kefiran, se realizează în următoarele etape:

- Depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur a unui mediu format din 2% glucoză, 2% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 2% triptonă, 0,2% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, și 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, cu un pH inițial de 5,5, gelifiat cu agar 20 g/l și sterilizat, cu o grosime de 8 mm;
- Inocularea în condiții axenice a mediului agarizat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și incubarea timp de 60 - 120 ore, la 30°C, în condiții

microaerofile, a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme dezvoltate, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 12 în 12 ore;

- Realizarea unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat, prin inocularea în condiții axenice, a celor 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, într-o placă de microtitrare cu 96 godeuri, care conține în fiecare godeu aceeași grosime, din același mediu agarizat. Incubarea timp de 60 - 120 ore, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginilor, din 12 în 12 ore;

- Analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor soft-uri specializate, compararea rezultatelor din proba cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină / izolat de testat s-a dezvoltat separat și identificarea microorganismelor interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare.

Prezentul procedeu prezintă următoarele avantaje:

- Utilizează microorganisme inoculante și microorganisme producătoare de kefiran/lactobacili compatibile, selectate rapid și eficient pentru a forma consorții de consens, cu o producere ridicată de kefiran în care se încapsulează și formează biofilm microorganismele inoculante;

- Este ușor de industrializat pentru că toate etapele, inclusiv cea de uscare, sunt ușor de ridicat la scară, existând utilaje specifice de diferite capacități;

- Asigură protejarea bacteriilor care sunt supuse procesului de uscare, atât datorită creșterii pe un mediu care determină acumularea de osmoprotectați, datorită nivelului ridicat de zinc care determină o supraexprimare a genelor implicate în acumularea de trehaloză / osmoprotectați, cât și adăugării de trehaloză și betaină în mediul din afara celulelor bacteriene, înainte de uscare;

- Permite formarea unor granule cu porozitate ridicată, care au o bună umectabilitate și din care microorganismele încapsulate se hidratează rapid, revenindu-și în starea activă metabolic;

- Are ca produs final o pulbere granulată care se poate utiliza ca atare, pentru tratament în brazdă de exemplu, cât și după resuspendare în apă, prin pulverizare.

În continuare se prezintă un exemplu de realizare care ilustrează invenția, fără a o limita.

Exemplul 1. Se prepară un mediu care conține 2% glucoză, 2% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 2% triptonă, 0.2% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, și 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. (Reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). Mediul se gelifiează cu 20 g/l agar (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA). Mediul agarizat se sterilizează prin autoclavare, la 121°C timp de 20 min. Într-o placă Cellstar® OneWell Plate™ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania) se adaugă aseptice 63,2 ml de mediul agarizat, lichefiat la cca 50°C, pentru a forma un strat de mediu de cultură cu grosime de 8 mm. Mediu se lasă la temperatura camerei în condiții aseptice pentru a se solidifica. Acest strat de mediu de cultură agarizat se inoculează axenic, cu 12 tulpini de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții. Inocularea se realizează cu mici cantități de inocul lichid, prelevat cu ajutorul unui replicator de inox cu 96 pini (Multi -Blot™ Replicator System, V&P Scientific, San Diego, CA, SUA), dintr-o placă cu 96 de godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor de testat, conform celor descrise în continuare. Într-o placă cu 96 de godeuri se distribuie aseptice tampon fosfat salin steril, câte 225 μl în fiecare godeu. Culturi re-împrospătate din tulpinile inoculanți de testat, realizate pe mediu lichid decoct de cartof – glucoză, timp de 24 ore în cazul procariotelor (bacterii, gram-negative sau gram-pozitive) și de 48 ore în cazul altor microorganisme, se normalizează prin diluție la 10^7 ufc/ml. Culturile de lactobacili, re-împrospătate pe mediu MRS (Oxoid, Thermo Scientific, Hampshire, Marea Britanie) se normalizează la 10^8 ufc/ml. Din aceste culturi se preiau 25 μl, care se aduc axenic peste cei 225 μl tampon fosfat salin steril, conform schemei de randomizare prezentată în tab. 1 de mai jos.

Tab.1. Schema de randomizare a celor 12 tulpini în 8 repetiții aplicată pentru placa cu 96 godeuri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6	11	2	7	12	3	8	9	4	5	10	1
B	12	3	7	9	4	8	10	1	5	11	2	6

C	4	8	9	1	5	10	2	6	11	3	7	12
D	8	12	1	5	11	4	6	10	3	7	9	2
E	11	4	5	10	3	6	9	2	7	12	1	8
F	3	6	10	2	7	9	1	8	12	4	5	11
G	7	10	4	6	9	1	5	12	2	8	11	3
H	9	1	6	12	2	5	11	3	8	10	4	7

Replicatorul de inox se sterilizează prin flambare, se răcește și apoi se scufundă în placa de 96 godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat. Pe fiecare pin se preiau câte 10-20 μ l de inocul lichid, cu 10^6 ufc/ml, datorită aderenței lichidului la suprafața metalului. Această mică cantitate de inocul este transferată pe stratul superior de mediu de cultură hidrogelifiat cu Poloxamer, prin presarea ușoară a replicatorului cu 96 pin pe suprafața respectivului mediu de cultură.

Placa inoculată se incubă timp de 60 - 120 ore, la temperaturi 30°C. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).

În paralel se realizează o placă martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat. Pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri cu fund plat (Corning® Costar® cell culture plates, Corning, NY, SUA), se distribuie câte 325 μ l de mediul agarizat, lichefiat la cca 50°C, pentru a forma un strat cu grosime de 8 mm. Cele 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, conform tab.1, se inoculează cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, care a fost în prealabil sterilizat prin flambare.

Plăcile martor cu 96 de godeuri, în care microorganismele inoculate se dezvoltă individual, fără a interacționa, se incubă timp de 60 - 120 ore, la aceeași temperatură ca și plăcile cu un singur godeu, în care microorganismele interacționează. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme dezvoltate în fiecare godeu, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene).

Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii se prelucrează cu ajutorul softului specializat, *open acces*, Colonyzer (Lawless *et al.* 2010, BMC Bioinformatics, 11, 287). Se obțin date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office, Microsoft, Redmond, WA, SUA), pentru dezvoltarea coloniilor. Se compară suprafețele coloniilor în proba cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au

dezvoltat în interacție reciprocă, în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină / izolat de testat s-a dezvoltat separat. Se identifică prin analiza varianței (ANOVA, StatSoft - Dell Software, Tulsa, OK, SUA) microorganismele care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare.

Tulpinile care se stimulează reciproc se selectează pentru etapa de verificare a capacității tulpinilor selectate de a forma consorții de consens. Într-o placă cu 12 godeuri (Evergreen, Los Angeles, CA, SUA), se distribuie aseptice câte 2,4 ml mediu lichid format din 2% glucoză, 2% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 2% triptonă, 0,2% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, și 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, cu un pH inițial de 5,5. Plăcile se inoculează cu perechile de microorganisme selecționate, lactobacil producător de kefiran și microorganisme inoculante. Plăcile inoculate se acoperă cu BREATHseal™ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania), și se trec la incubator la 28°C. Se mențin plăcile în condiții de microaerofilie, fără agitare și în atmosferă cu oxigen timp de 72 de ore. La sfârșitul perioadei de incubare se determină în fiecare godeu cantitatea de kefiran produsă (prin utilizarea metodei descrise de Cheirsilp et al. 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57: 639–646), care se compară cu cea a unei probe martor, în care respectiva tulpină de lactobacil a fost cultivată singură, în același mediu de cultură și în aceleași condiții de temperatură și aerare. Formarea de biofilme de către microorganismele inoculante se determină prin metoda descrisă de Habibi et al 2011, World Appl. Sci. J., 12:1-16. În culturile de microorganism inoculante se determină, caracteristicile lor specifice, în directă legătură cu activitatea lor biologică benefică (producere de fitohormoni, siderofori, antibiotice, hidrolaze, solubilizare fosfor, etc.).

Într-un bioreactor (Biostat® B, Goettingen, Germania), prevăzut cu senzor de pH și senzor de oxigen dizolvat (DO) (InPro6800; Mettler-Toledo AG, Greifensee, Elveția), prevăzut cu un vas de 5 litri, se aduc 2 litri mediu lichid, format din % lactoză, 2,5% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,02% Zn : glicerol (1:4) 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Mediul se sterilizează, se răcește la temperatura de 28°C și se inoculează cu câte 10 ml 1×10^8 ufc, de suspensii de tulpini

compatibile, producătoare de consozii de consens, de lactobacili producători de kefiran și microorganisme inoculante.

Complexul Zn / glicerol utilizat este preparat după cum urmează: 30 g de acetat de zinc hidratat, $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ și 52 g de glicerol (4 echivalenți) sunt încălzite într-un balon cu fundul plat de 500 ml la 120°C pe baie de ulei (110°C temperatura internă). Amestecul este agitat mecanic cu un turbomixer cu cuțit de inox. După menținere trei ore la 120°C amestecul este răcit și centrifugat la 4500 rpm pentru 30 minute. Supernatantul clar este înlăturat, iar sedimentul alb este reluat în iso-propanol și resuspendat. În final se aduce la 100 ml cu i-propanol, se filtrează prin pânză de sticlă sinterizată și se readuce din nou la cota de 100 ml. Soluția rezultată se evaporă la sec, iar reziduul este reluat cantitativ și cântărit.

Consoziiul de microorganisme compatibile, de lactobacili producători de kefiran și microorganisme inoculante, se cultivă timp de 96 ore, la 10% saturație de oxigen, la 28°C și pH 6.0. Se separă prin centrifugare la 8000 g granulele de kefir, formate în cantitate de cel puțin 4 g/l, care apoi se omogenizează la un turbo-mixer în prezență de 0,1M trehaloză și 0,02 M betaină. Amestecul microorganisme – kefiran se deshidratează prin uscare prin pulverizare la o temperatură de 120 ... 140°C intrare agent de uscare și 70 ... 75°C ieșire agent de uscare.

Se formează o pulbere granulară care conține cel puțin 10^8 ufc/g microorganisme inoculante benefice.

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui biopreparat inoculant conform invenției caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: selecția tulpinilor compatibile de microorganisme inoculante și de microorganisme producătoare de kefiran printr-o tehnică de screening de înalt randament; verificarea capacității tulpinilor selectate de a forma consorții de consens, prin determinarea producerii de kefiran, menținerea caracteristicilor biologice ale microorganismelor inoculante și formarea de biofilme de către respectivele microorganisme inoculante, prin co-cultivare în condiții microaerofile, pe un mediu lichid, format din 2% glucoză, 2% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 2% triptonă, 0,2% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, și 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, cu un pH inițial de 5,5, distribuit câte 2,4 ml în plăci cu 12 godeuri; co-cultivarea consorțiilor de microorganisme selectate pe un mediu lichid format din 2% lactoză, 2,5% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,02% Zn : glicerol (1:4) 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, aerat până la 10% saturație de oxigen, timp de 96 ore la 28°C și pH 6.0; separarea granulelor de kefiran din mediul lichid, omogenizarea acestora la un turbo-mixer în prezență de 0,1M trehaloză și 0,02 M betaină, și uscarea prin pulverizare în condiții blânde, la o temperatura de 120 ... 140°C intrare agent de uscare și 70 ... 75°C ieșire agent de uscare.

- Procedeu de obținere a unui biopreparat inoculant conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că selecția tulpinilor compatibile de microorganisme inoculante și de microorganisme producătoare de kefiran printr-o tehnică de screening de înalt randament , se realizează în următoarele etape: depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur a unui mediu format din 2% glucoză, 2% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 2% triptonă, 0,2% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, și 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, cu un pH inițial de 5,5, gelificat cu agar 20 g/l și sterilizat, cu o grosime de 8 mm; inocularea în condiții axenice a mediului agarizat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și incubarea timp de 60 -

120 ore, la 30°C, în condiții microaerofile, a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme dezvoltate, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 12 în 12 ore; realizarea unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat, prin inocularea în condiții axenice, a celor 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, într-o placă de microtitrare cu 96 godeuri, care conține în fiecare godeu aceeași grosime, din același mediu agarizat. Incubarea timp de 60 - 120 ore, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginilor, din 12 în 12 ore; analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor soft-uri specializate, compararea rezultatelor din proba cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină / izolat de testat s-a dezvoltat separat și identificarea microorganismelor interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare.