



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00881

(22) Data de depozit: 22/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• BADEA DONI MIHAELA,
BD. CAMIL RESSU NR. 4, BL. 5, SC. C,
AP. 115, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• VULUGA ZINA,
ALEEA DEALUL MĂCINULUI NR.7, BL.D 34,
SC.B, ET.2, AP.22, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CĂLIN MARIANA,
STR. CETATEA DE BALTĂ NR. 41, BL. 07A,
SC. 2, ET. 6, AP. 91, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ARSENE MELANIA LILIANA, STR. COZIA
NR. 8, BL. A7, SC. 4, AP. 49, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE CREȘTERE A EFICIENȚEI
PROCESULUI DE BIOMINERALIZARE
REALIZAT DE MICROORGANISMELE
ÎNGLOBATE ÎN MATERIALE DE CONSTRUCȚIE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei suspensii utilizată pentru repararea suprafețelor de piatră sau cimentarea agregatelor minerale. Procedeu conform invenției constă în cultivarea microorganismelor producătoare de uree în condiții axenice, pe medii minimale lichide, care includ 2% dioxid de siliciu coloidal, recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal, amestecarea acestora cu vinasă având un conținut de minimum 60% substanță

uscată, din care 15% este glicil-betaină și 8% este potasiu, urmată de uscarea amestecului final până la maximum 5% umiditate reziduală, rehidratarea și suspendarea a 3...5 părți amestec final cu 15...30 părți soluție 3M uree și 1M CaCl₂, rezultând o suspensie de bacterii-siliciu coloidal-vinasă-uree-clorură de calciu cu acțiune de biomineralizare.

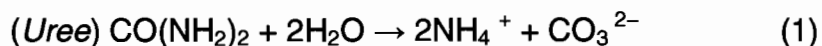
Revendicări: 2



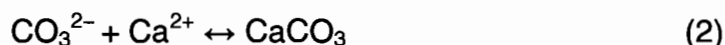
PROCEDEU DE CREȘTERE A EFICIENȚEI PROCESULUI DE BIOMINERALIZARE REALIZAT DE MICROORGANISMELE ÎNGLOBATE ÎN MATERIALE DE CONSTRUCȚIE

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru creșterea eficienței procesului de biomineralizare, realizat de microorganismele producătoare de urează, care sunt înglobate în diferite materiale de construcție în vederea obținerii unei mai mari rezistențe la compresie și a unor suprafețe cu capacitate ridicată de auto-reparare.

Sunt cunoscute diferite procedee în care sunt utilizate microorganisme care au capacitate ridicată de precipitare a carbonatului de calciu, datorită producerii de urează. Hidroliza ureei sub acțiunea ureazei produse de microorganisme formează ioni de amoniu și de carbonat (Ecuția 1):



Ionii de carbonat precipită împreună cu excesul de ioni de calciu, formând carbonat de calciu (Ecuția 2):



Ionii de amoniu favorizează precipitarea ionilor de calciu datorită pH-ului alcalin. Întrucât peretele celular al bacteriilor este anionic, carbonatul de calciu se acumulează la suprafața celulelor bacteriene, în special ca forme cristaline cu termostabilitate ridicată, vatit și calcit, care cresc rezistența la compresibilitate a materialului de construcție rezultat.

Procedeele cunoscute exploatează practic în principal două caracteristici specifice ale acestui proces de biomineralizare realizat de microorganismele producătoare de urează: (i) (auto)repararea suprafețelor materialelor de construcție și (ii) obținerea de materiale cu o mai mare rezistență la compresie, datorită în special acumulării de calcit și vatit.

Unul dintre primele procedee brevetate avea ca scop restaurarea patrimoniului din piatră prin formarea *in-situ* a carbonatului de calciu ca urmare a activității microorganismele mineralizante – Brevet EP 0388304. Acest brevet revendică procesul de precipitare a carbonatului de calciu de către bacterii și cianobacterii cultivate pe mediu de cultură care este pus în contact cu materialul de tratat. Bacteriile sunt din familia *Bacillaceae*, preferabil din genul *Bacillus*, *Pseudomonadaceae*, preferabil din genul *Pseudomonas*, sau *Enterobacteriaceae*, preferabil din genul *Proteus*. Brevetul FR 2734261 prezintă o compoziție de mortar

biologic, destinat în special reparării suprafețelor monumentelor, care include, pe lângă o cantitate eficace de microorganisme și un mediu de cultură, și o încărcătură de agregate minerale, cu o granulometrie micrometrică. Microorganismele sunt exemplificate prin specii aparținând familiilor *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* sau *Vibrionaceae*.

Brevetul CN100357444 C se referă la producerea de carbonat de calciu, destinat umplerii / reparării suprafețelor sau cimentării regenerative, într-un mediu de cultură al bacteriilor *Bacillus pasteurii*, care conține uree și clorură de calciu. Brevetul KR 101448157 B1 protejează tulpina *Sporosarcina pasteurii* WJ-4 (depozitată sub numărul KCTC 12374BP) și un procedeu de obținerea a carbonatului de calciu prin utilizarea acestei bacterii, care implică utilizarea unui mediu de cultură cu uree și cu clorură de calciu. Pentru a crește grosimea stratului depus și pentru a accelera procesul de bio-remediere a suprafețelor materialelor de construcție, fost propusă utilizarea hidroxidului de calciu sub formă de nanoparticule, împreună cu bacterii alcalino-tolerante care produc urează, *Bacillus sphaericus* sau *Sporosarcina pasteurii*, și cu un mediu nutritiv bogat în uree (Cerere de brevet WO 2013120847 A1).

Brevetul US 9428418 B2, reprezentativ pentru categoria procedeelelor destinate obținerii de materiale cu o mai mare rezistență la compresie, descrie un procedeu de producere a unor astfel de materiale de construcție, care utilizează agregate mărunțite, microorganisme producătoare de urează, uree și clorură de calciu. Microorganismele utilizate includ *Sporosarcina pasteurii*, *Sporosarcina ureae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus sphaericus*, *Myxococcus xanthus*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, singure sau în combinație.

O limitare comună a procedeelelor de mai sus este dată de utilizarea ureei. Eficiența procesului de biomineralizare / biocalcifiere cu microorganisme producătoare de urează este dată de concentrația de uree prezentă în mediu. Concentrația de uree nu poate fi crescută foarte mult datorită efectului denaturant al ureei asupra proteinelor (Bennion și Daggett, 2003. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 5142-5147). Datorită acestei limitări, a fost propusă înlocuirea ureei în procesul de biomineralizare / biocalcifiere cu bioxid de carbon (Kaur et al. 2016. *Construction and Building Materials*, **123**, 527-533). Injecția eficientă de bioxid de carbon în cantități mari de materiale de construcții este însă dificil de realizat, deci sunt necesare soluții alternative.

Autorii au constat că glicil-betaina, un cunoscut solut compatibil care crește stabilitatea proteinelor are un efect de contracarare al efectelor denaturante ale ureei asupra proteinelor bacteriilor biocalcifiante. Acest efect protector al glicil-betainei față de uree este amplificat atunci când bacteriile au amorsat sistemul de apărare față de factorii de stres abiotici.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu prin care să se poată crește concentrația de uree utilizată pentru realizarea reacțiilor de biocalcifiere prin utilizarea optimă a efectului protector al unei surse accesibile de glicil-betaine, pe bacterii ureolitice cărora li s-a amorsat sistemul de apărare față de factorii de stres abiotici.

Procedeul conform invenției constă în următoarele etape:

- Cultivarea microorganismelor producătoare de uree în condiții axenice, pe medii minimale lichide, care includ 2% dioxid de siliciu coloidal, la pH optim și la aerări de până la 20% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 25°C și 12 ore la 35°C, timp de 3 zile;
- Recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar;
- Amestecarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal cu vinasă concentrată, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme și siliciu coloidal la 3 – 5 părți vinasă concentrată, urmată de uscarea prin pulverizare a amestecului biomasă de microorganisme, siliciu coloidal, vinasă concentrată, la o temperatură de intrare de 130-150°C și o temperatură de ieșire de 75-85°C, până la max. 5% umiditate reziduală;
- Re-hidratarea și suspendarea a 3-5 părți amestec biomasă de microorganisme – siliciu coloidal – vinasă concentrată cu 15- 30 părți soluție de 3 M uree și 1 M CaCl₂.
- Utilizarea suspensiei rezultate pentru repararea suprafețelor sau pentru cimentarea agregatelor minerale.

Vinasa utilizată în procesul de mai sus are un conținut de min 60% substanță uscată, dintre care min. 15% este glicil-betaină, iar min. 8% este potasiu.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Permite creșterea eficienței procesului microbiologic de biomineralizare prin precipitarea carbonatului de calciu, pentru că menține activitatea ureazică ridicată

în prezența unor concentrații mari, denaturante de uree și clorură de calciu, datorită efectului protector al betainei din vinasă concentrată;

- Reduce costurile de utilizare pentru că folosește vinasă, un subprodus al industriei alimentare cu accesibilitate ridicată;
- Determină o rată de supraviețuire avansată a microorganismelor, care sunt cultivate în condiții care să favorizeze amorsarea mecanismelor interne de rezistență la factorii de stres abiotici, datorită efectului de amorsare al sistemului de apărare exercitat de fluxul de acid silicic, combinat cu șocurile de temperatură din timpul cultivării;

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplu 1. 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 minimal M9 care conține la 1 litru: Na₂HPO₄ (anhidru) 6 g; KH₂PO₄ 3 g; NaCl 0.5 g; NH₄Cl 1 g, 10 g lactoză. Se suspendă în mediul rezultat 40 g de dioxid de siliciu coloidal, 270 și 330 m²/g, un conținut de bioxid de siliciu de min. 98% și generează suspensii cu un pH de 5,5.. Mediul rezultat se sterilizează prin autoclavare *in-situ*, și apoi se adaugă nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,1 mM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 3x10⁻⁹ M; H₃BO₃ 4x10⁻⁷ M; CoCl₂·6 H₂O 3x10⁻⁸ M; CuSO₄·5H₂O 1x10⁻⁸ M; MnCl₂·4H₂O 8x10⁻⁸ M; ZnSO₄·7H₂O 1x10⁻⁸ M; FeSO₄·7H₂O 1x10⁻⁶ M, provenite din soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare. Se verifică pH-ul și se aduce la pH 5,5 cu HCl 1 M sau NaOH 1 M.

Toți reactivi folosiți sunt proveniți de la Merck-Millipore, Darmstadt, Germania, cu excepția dioxidului de siliciu coloidal, care este Aerosil[®] 300 Pharma (Evonik Resource Efficiency, Hanau-Wolfgang, Germania). Orice alți reactivi care au aceleași caracteristici tehnice pot fi utilizați.

Mediul se inoculează cu 100 ml de suspensie bacteriană, din tulpina *Brevibacillus parabrevis* B50, NCAIM (P) B 001413. Suspensia bacteriană este normalizată la 10⁹ propagule per ml prin determinarea turbidității. Tulpina *Brevibacillus parabrevis* B50, din colecția INCDPC-ICECHIM, este o tulpină multifuncțională, foarte rezistentă la condițiile de mediu, fiind cunoscută ca având și activitate ureazică (Raut et al. 2013 *Rev. Roum. Chim*, 58, 59-64). Se cultivă tulpina B50 timp de 3 zile, la o rată de aerare de până la 50% saturație de oxigen, cu

variarea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 25°C și 12 ore la 35°C.

Din oră în oră se prelevează aseptice probe de 2- 2,4 ml mediu de cultură cu microorganisme, în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Se separă prin centrifugare sedimentul microbial înglobat într-un gel de silice. Din supernatant se preiau probe de câte 1 ml, care se diluează cu 4 ml apă ultrapură, în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber este determinat apoi cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Testul colorimetric pentru acidul silicic liber este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, care formează un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația de acid silicic este calculată după construcția unei curbe de calibrare, folosind un standard de acid silicic (Merck 170236, Merck-Millipore). În mediu de cultură se determină o concentrație de acid ortosilicic care este permanent de sub 1 mM, fiind consecința a două procese concomitente – solubilizarea acidului ortosilicic din silicagel, sub efectul metabolismului microbial și asimilarea acidului ortosilicic. În sedimentul de microorganisme se determină siliciul total, după mineralizare, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, *Geoderma*, 209, 251-261). Se constată o continuă creștere a conținutului de siliciu în biomasa de microorganisme, creștere care dovedește asimilarea acidului ortosilicic de către microorganisme. Acest flux de siliciu a fost determinat de autori ca având un rol de amorsare a mecanismelor de apărare din microorganisme față de factorii de stres abiotici, similar cu cel exercitat în cazul plantelor (Cooke și Leishman, 2016, *Functional Ecology*, 30, 1340-1357).

După terminarea perioadei de cultivare se recoltează biomasa de microorganisme și dioxidul de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar, folosind o unitate Sartolab® (Sartorius, Goettingen, Germania). Gelul rezultat prin filtrare este resuspendat în apă pură miliQ (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-Millipore).

Se amestecă biomasa de microorganisme și dioxidul de siliciu coloidal cu vinasă concentrată, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme și siliciu coloidal la 3 părți vinasă concentrată. La cele 50 de grame de amestec biomasă de microorganisme / dioxid de siliciu coloidal se adaugă 150 părți vinasă. Se usucă prin pulverizare amestecul biomasă de microorganisme, siliciu coloidal, vinasă concentrată, la o temperatură de intrare de 130-150°C și o temperatură de ieșire de

75-85°C, până la max. 5% umiditate reziduală. Se folosește un echipament de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor. Instalații de uscare prin pulverizare care pot fi utilizate în acest scop sunt de exemplu: Niro Production Minor Unit, produsă de Niro Gea (Soeborg, Danemarca) sau Laboratory Spray Dryer, produsă de ICF Cibec (Maranello, Italia). Orice alt tip de instalație de uscare prin pulverizare, cu caracteristici tehnici similare, poate fi utilizată.

Vinasa utilizată în procesul de mai sus este vinasă concentrată provenită din procesul de fabricare a drojdiei de panificație, prin cultivare pe mediu cu melasă (Rompack, Pașcani) și are un conținut de min 60% substanță uscată, dintre care min. 15% este glicil-betaină, iar min. 8% este potasiu. Orice altă vinasă cu caracteristici similare poate fi utilizată.

Amestecul uscat, în care microorganismele sunt în stare de dormanță, protejate de straturile de silicagel, ca și de prezența betainei și a anti-oxidanților din vinasă, este bioprodusul care se stochează până la utilizare. Bioprodusul rezultat din proces până în această etapă se poate folosi împreună cu cantități precis cântărite de uree și clorură de calciu, ca un kit pentru realizarea procedurii de biomineralizare cf. invenției.

Se rehidratează 30 g amestec biomasă de microorganisme – siliciu coloidal – vinasă concentrată cu 150 g soluție de 3 M uree și 1 M CaCl₂. Se testează utilizarea suspensiei rezultate pentru tratamentul suprafețelor. Se utilizează ca test blocuri de calcar de 9 X 9 X 2 cm. Două blocuri de calcar se introduc în suspensia de microorganisme - siliciu coloidal – vinasă – uree – clorură de calciu și se menține timp de 10 zile la 37°C în condiții aerobe. Alte două blocuri de calcar se introduc într-o suspensie de microorganisme – uree – clorură de calciu unde se mențin 10 zile la 37°C în condiții aerobe, iar alte două blocuri se lasă netratate. În cazul blocurile introduse în suspensie preparată conform invenției, se constată formarea unor depozite de carbonat de calciu, care conferă un aspect strălucitor și o duritate superioară, în testul de zgâriere cu lame de oțel, comparativ cu blocurile ne-expuse. Examinarea la microscopul binocular demonstrează o grosime a stratului de carbonat de calciu format prin biodepozitare / biomineralizare de peste 10 mm. Observațiile sunt confirmate prin analiza probelor la microscopic optic cu lumină polarizată, ca și în cazul examinării la microscopul electronic de baleiaj. În cazul blocurilor imersate în suspensie de microorganisme – uree – clorură de calciu stratul de carbonat de calciu

format este de dimensiuni semnificativ reduse (grosime medie de 2,5 mm) și cu o duritate similară probei martor, ne-expusă acțiunii de bio-depunere prin precipitarea carbonatului de calciu.

Exemplul 2. Se lucrează ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe. Sporosarcina pasteurii, tulpină tip (număr de catalog colecției de microorganisme ATCC 11859, CCM 2056, NCIB 8841, NCTC 4822, DSM 33). Se amestecă biomasa de microorganisme și dioxidul de siliciu coloidal cu vinasă concentrată, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme și siliciu coloidal la 5 părți vinasă concentrată. Se rehidratează 50 g amestec biomasă de microorganisme – siliciu coloidal – vinasă concentrată cu 300 g soluție de 3 M uree și 1 M CaCl₂. Se utilizează pentru cimentarea diferitelor tipuri de agregate, în cadrul unui experiment controlat. Se folosesc tuburi de seringi de 60 ml, de masă cunoscută, care se umplu cu următoarele tipuri de agregate: V₁ - 5 g granule poroase de sticlă Poraver™ 2 mm - 1 mm (Dennert Poraver, Schlüsselfeld, Germania); V₂ – 30 g nisip cuarțos de Aghireș pentru construcții, 0,2 -0,63 mm (Bega Minerale Industriale, Timișoara, România); V₃ – 30 g Nisip pentru construcții 0,1-0,63 mm (Bega Minerale Industriale, Timișoara, România). S-a introdus suspensia de bacterii – siliciu coloidal – vinasă – uree – clorură de calciu, la un debit gravitațional de 0,1 ml/min, cu ajutorul unor furtunuri de silicon, amplasate la intrarea și ieșirea seringii. S-a recirculat soluția timp de 5 zile. S-a scurs tot excesul de soluție prin presare cu pistonul repetată după care s-au cântărit seringile, pentru a se stabili acumularea de material. S-a lucrat față de 3 variante de referință, în care s-au folosit aceleași agregate minerale, dar s-a recirculat o suspensie bacteriană care a fost realizată fără vinasă. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tab.1. Acumularea de carbonat de calciu în diferitele variante experimentale

Varianta experimentală	Masa inițială (g)	Masa finală (g)	Carbonat de calciu precipitat (g)
V ₁ – Poraver, amestec cf. invenției	5	10,87	5,87
V ₂ – Nisip cuarțos, 0,2-0,63 mm, amestec cf. invenției	30	42,7	12,7
V ₃ – Nisip construcții, 0,1-0,63 mm, amestec cf. invenției	30	38,42	8,42
V ₄ – Poraver, amestec referință	5	8,46	3,46
V ₅ – Nisip cuarțos, 0,2-0,63 mm, amestec referință	30	37,6	7,6
V ₆ – Nisip construcții, 0,1-0,63 mm, amestec referință	30	35,8	5,8

Analizele de rezistență mecanică demonstrează că probele realizate cu bacterii protejate cu betaină / vinasă au o rezistență superioară la compresie, iar analiza microscopică și de difracție de raze X arată că s-a acumulat mai mult calcit în probele în care s-au folosit bacterii protejate cu vinasă / betaină.

Revendicări

1. Procedeu de creștere a eficienței procesului de biomineralizare realizat de microorganismele înglobate în materiale de construcție, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: cultivarea microorganismelor producătoare de uree în condiții axenice, pe medii minimale lichide, care includ 2% dioxid de siliciu coloidal, la pH optim și la aerări de până la 20% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 25°C și 12 ore la 35°C, timp de 3 zile; recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar; amestecarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal cu vinasă concentrată, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme și siliciu coloidal la 3 – 5 părți vinasă concentrată, urmată de uscarea prin pulverizare a amestecului biomasă de microorganisme, siliciu coloidal, vinasă concentrată, la o temperatură de intrare de 130-150°C și o temperatură de ieșire de 75-85°C, până la max. 5% umiditate reziduală; rehidratarea și suspendarea a 3-5 părți amestec biomasă de microorganisme – siliciu coloidal – vinasă concentrată cu 15- 30 părți soluție de 3 M uree și 1 M CaCl₂; utilizarea suspensiei rezultate pentru repararea suprafețelor din piatră sau pentru cimentarea agregatelor minerale.
2. Procedeu de creștere a eficienței procesului de biomineralizare realizat de microorganismele înglobate în materiale de construcție conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** vinasă utilizată în procesul de mai sus are un conținut de min 60% substanță uscată, dintre care min. 15% este glicil-betaină, iar min. 8% este potasiu.