



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00881**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/04/2020** BOPI nr. **4/2020**

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

(73) Titular:

• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 2013120847 (A1); US 2016068438 (A1)

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

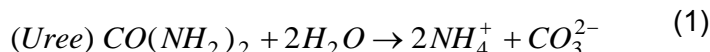


RO 132572 B1

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

5 Procedeu este utilizat la creșterea eficienței procesului de biomineralizare, realizat
de microorganismele producătoare de urează, care sunt înglobate în diferite materiale de
7 construcție.

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



13 Ioni de carbonat precipită împreună cu excesul de ioni de calciu, formând carbonat
de calciu (ecuația 2):



17 Ioni de amoniu favorizează precipitarea ionilor de calciu datorită pH-ului alcalin,
19 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
21 și calcit, care cresc rezistența la compresibilitate a materialului de construcție rezultat.

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

Unul dintre primele procedee brevetate avea ca scop restaurarea patrimoniului din
27 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
29 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
31 din genul *Bacillus*, *Pseudomonadaceae*, preferabil din genul *Pseudomonas*, sau
Enterobacteriaceae, preferabil din genul *Proteus*. Brevetul **FR 2734261** prezintă o compoziție
33 de mortar biologic, destinat în special reparării suprafețelor monumentelor, care include, pe
lângă o cantitate eficace de microorganismele și un mediu de cultură, și o încărcătură de
35 agregate minerale, cu o granulometrie micrometrică. Microorganismele sunt exemplificate
prin specii aparținând familiilor *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* sau
37 *Vibrionaceae*.

Documentul de brevet **CN 100357444 C** se referă la producerea de carbonat de
39 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
41 **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
43 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
45 suprafețelor materialelor de construcție, a fost propusă utilizarea hidroxidului de calciu sub
formă de nanoparticule, împreună cu bacterii alcalino-tolerante care produc urează, *Bacillus*
47 *sphaericus* sau *Sporosarcina pasteurii*, și cu un mediu nutritiv bogat în uree (cerere de brevet
WO 2013120847 A1).

RO 132572 B1

Brevetul US 9428418 B2 , reprezentativ pentru categoria procedeeleor 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 <i>Sporosarcina pasteurii</i> , <i>Sporosarcina ureae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Myxococcus xanthus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , singure sau în combinație.	1 3 5
O limitare comună a procedeeleor 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.	7 9 11 13 15
Autorii au constatat că glicil-betaina, un cunoscut solut compatibil care crește stabilitatea proteinelor, are un efect de contracarare a 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.	17 19
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unei suspensii pentru repararea suprafețelor din piatră cu scopul de a realiza rezistențe mari la compresie.	21
Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că va consta în următoarele etape:	23
- 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 h la 25°C și 12 h la 35°C, timp de 3 zile;	25 27
- recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de minimum - 0,5 bar;	29
- 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 maximum 5% umiditate reziduală;	31 33 35
- 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 CaCl ₂ ;	37
- utilizarea suspensiei rezultate pentru repararea suprafețelor sau pentru cimentarea agregatelor minerale.	39
Vinasa utilizată în procesul de mai sus are un conținut de minimum 60% substanță uscată, dintre care minimum 15% este glicil-betaina, iar minimum 8% este potasiu.	41
Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje:	43
- 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;	45 47

RO 132572 B1

1 - reduce costurile de utilizare pentru că folosește vinasă, un subprodus al industriei
alimentare cu accesibilitate ridicată;

3 - determină o rată de supraviețuire avansată a microorganismelor, care sunt cultivate
în condiții care să favorizeze amorsarea mecanismelor interne de rezistență la factorii de
5 stres abiotici, datorită efectului de amorsare al sistemului de apărare exercitat de fluxul de
acid silicic, combinat cu șocurile de temperatură din timpul cultivării;

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

9 Exemplul 1

11 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 L, se aduc 2 L mediu minimal M9 care conține la 1 l: Na₂HPO₄
13 (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
15 minimum 98% și se 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:
17 MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,1 mM; (NH₄)₆Mo7O₂₄ · 4H₂O 3 x 10⁻⁹ M; H₃BO₃ 4 x 10⁻⁷ M;
CoCl₂ · 6H₂O 3 x 10⁻⁸ M; CuSO₄ · 5H₂O 1 x 10⁻⁸ M; MnCl₂ · 4H₂O 8 x 10⁻⁸ M; ZnSO₄ · 7H₂O
19 1 x 10⁻⁸ M; FeSO₄ · 7H₂O 1 x 10⁻⁶ 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.

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

25 Mediul se inoculează cu 100 ml de suspensie bacteriană, din tulpina *Brevibacillus*
parabrevis B50, NCAIM (P) B 001413. Suspensia bacteriană este normalizată la 10⁹
27 propagule per ml prin determinarea turbidității. Tulpina *Brevibacillus parabrevis* B50, din
colecția INCDP-ICECHIM, este o tulpină multifuncțională, foarte rezistentă la condițiile de
29 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
31 de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 h la 25°C și 12 h
la 35°C.

33 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
35 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
37 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
39 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
41 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
43 mediu de cultură se determină o concentrație de acid ortosilicic care este permanent sub
1 mM, fiind consecința a două procese concomitente - solubilizarea acidului ortosilicic din
45 silicagel, sub efectul metabolismului microbial și asimilarea acidului ortosilicic. În sedimentul
de microorganisme, se determină siliciul total, după mineralizare, prin ICP-OES (**Georgiadis**
47 **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

RO 132572 B1

de către microorganisme. Acest flux de siliciu a fost determinat de autori ca având un rol de	1
amorsare a mecanismelor de apărare din microorganisme față de factorii de stres abiotici,	
similar cu cel exercitat în cazul plantelor (Cooke și Leishman, 2016, Funcțional Ecology,	3
30, 1340-1357).	
După terminarea perioadei de cultivare, se recoltează biomasă de microorganisme	5
și dioxidul de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de minimum - 0,5 bar, folosind	
o unitate Sartolab® (Sartorius, Goettingen, Germania). Gelul rezultat prin filtrare este	7
resuspendat în apă pură miliQ (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-Millipore).	
Se amestecă biomasă de microorganisme și dioxidul de siliciu coloidal cu vinasă	9
concentrată, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme și siliciu coloidal la 3 părți	
vinasă concentrată. La cele 50 g de amestec biomasă de microorganisme/dioxid de siliciu	11
coloidal, se adaugă 150 părți vinasă. Se usucă prin pulverizare amestecul biomasă de	
microorganisme, siliciu coloidal, vinasă concentrată, la o temperatură de intrare de	13
130...150°C și o temperatură de ieșire de 75...85°C, până la maximum 5% umiditate	
reziduală. Se folosește un echipament de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer	15
încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20000 rpm a discului atomizor. Instalații	
de uscare prin pulverizare care pot fi utilizate în acest scop sunt, de exemplu: Niro	17
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	19
pulverizare, cu caracteristici tehnici similare, poate fi utilizată.	
Vinasa utilizată în procesul de mai sus este vinasă concentrată provenită din procesul	21
de fabricare a drojdiei de panificație, prin cultivare pe mediu cu melasă (Rompac, Pașcani)	
și are un conținut de minimum 60% substanță uscată, dintre care minimum 15% este glicil-	23
betaină, iar minimum 8% este potasiu. Orice altă vinasă cu caracteristici similare poate fi	
utilizată.	25
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	27
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	29
calciu, ca un kit pentru realizarea procedurii de biomineralizare conform invenției.	
Se rehidratează 30 g amestec biomasă de microorganisme - siliciu coloidal - vinasă	31
concentrată cu 150 g soluție de 3 M uree și 1 M CaCl ₂ . Se testează utilizarea suspensiei	
rezultate pentru tratamentul suprafețelor. Se utilizează ca test blocuri de calcar de	33
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 mențin timp de 10 zile la 37°C în condiții	35
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	37
lasă netratate. În cazul blocurile introduse în suspensia preparată conform invenției, se	
constată formarea unor depozite de carbonat de calciu, care conferă un aspect strălucitor	39
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	41
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	43
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	45
dimensiune semnificativ redusă (grosime medie de 2,5 mm) și cu o duritate similară probei	
martor, ne-expusă acțiunii de bio-depunere prin precipitarea carbonatului de calciu.	47

RO 132572 B1

1 Exemplul 2

3 Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. *Sporosarcina pasteurii*,
5 tulpină tip (număr de catalog colecții de microorganisme ATCC 11859, CCM 2056,
7 NCIB 8841, NCTC 4822, DSM 33). Se amestecă biomasa de microorganisme și dioxidul de
9 siliciu coloidal cu vinasă concentrată, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme și
11 siliciu coloidal la 5 părți vinasă concentrată. Se rehidratează 50 g amestec biomasă de
13 microorganisme - siliciu coloidal - vinasă concentrată cu 300 g soluție de 3 M uree și
15 1 M CaCl₂. Se utilizează pentru cimentarea diferitelor tipuri de agregate, în cadrul unui
17 experiment controlat. Se folosesc tuburi de seringi de 60 ml, de masă cunoscută, care se
19 umplu cu următoarele tipuri de agregate: V₁ - 5 g granule poroase de sticlă Poraver™
21 2...1 mm (Dennert Poraver, Schlusselfeld, Germania); V₂ - 30 g nisip cuarțos de Aghireș
23 pentru construcții, 0,2...0,63 mm (Bega Minerale Industriale, Timișoara, România); V₃ - 30 g
25 nisip pentru construcții 0,1...0,63 mm (Bega Minerale Industriale, Timișoara, România). S-a
27 introdus suspensia de bacterii - siliciu coloidal - vinasă - uree - clorură de calciu, la un debit
29 gravitațional de 0,1 ml/min, cu ajutorul unor furtunuri de silicon, amplasate la intrarea și
31 ieșirea seringii. S-a recirculat soluția timp de 5 zile. S-a scurs tot excesul de soluție prin
33 presare cu pistonul repetat, 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 tabel:

21 Acumularea de carbonat de calciu în diferite variante experimentale

23 Varianta experimentală	Masa inițială (g)	Masa finală (g)	Carbonat de calciu precipitat (g)
25 V ₁ - Poraver, amestec cf. invenției	5	10,87	5,87
27 V ₂ - Nisip cuarțos, 0,2...0,63 mm, amestec	30	42,7	12,7
29 V ₃ - Nisip construcții, 0,1...0,63 mm, amestec	30	38,42	8,42
31 V ₄ - Poraver, amestec referință	5	8,46	3,46
33 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

35 Analizele de rezistență mecanică demonstrează că probele realizate cu bacterii
37 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.

1. Procedeu de creștere a eficienței procesului de biomineralizare realizat de microorganismele înglobate în materiale de construcție, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape: cultivarea microorganismelor producătoare de uree în condiții axenice, pe medii minimale lichide, care includ 2% dioxid de siliciu coloidal, la pH optim cu aerare de până la 20% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare după următorul program: de la 10°C și 25°C la 12 h până la 35°C timp de 3 zile; recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de minimum - 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 maximum 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. 17

2. Procedeu de obținere a unei suspensii conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** vinasă utilizată are un conținut de minimum 60% substanță uscată, dintre care minimum 15% este glicil-betaină, iar minimum 8% este potasiu. 19

