



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 00702**

(22) Data de depozit: **20/09/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2019 BOPI nr. **7/2019**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PEDOLOGIE, AGROCHIMIE ȘI PROTECȚIA
MEDIULUI - ICPA BUCUREȘTI,
BD.MĂRĂȘTI NR.61, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **MATEI SORIN,
STR.GEORGE CALBOREANU NR.4,
BL.122, SC.B, AP.68, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MATEI GABI MIRELA,
STR.CALBOREANU GEORGE, NR.4,
BL.122, SC.B, ET.6, AP.68, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DRĂGHICI ELENA MARIA, STR.PRESEI
NR.1, BL.28, SC.B, AP.1, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SOMĂCESCU CLAUDIU VASILE,
STR.MUNTELE LUNG, NR.16B, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **TULPINĂ DE CANDIDA PARAPSILOSIS PRODUCĂTOARE
DE BIOSURFACTANȚI, MEDIU DE CREȘTERE
ȘI STIMULARE A ACESTEIA, ȘI PROCEDEU
DE BIOAUGMENTARE A PERLITULUI EXPANDAT
PENTRU BIOREMEDIEREA SOLURILOR CONTAMINATE
CU HIDROCARBURI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui adsorbant utilizat în bioremedierea solurilor contaminate cu petrol. Procedeu conform invenției constă în imobilizarea pe un suport poros, anorganic, natural, de tip perlit expandat cu granulație de 4 mm, a celulelor aparținând tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis*, selectată din soluri contaminate cu hidrocarburi petro-

liere, dezvoltată într-un mediu de creștere și stimulare, rezultând un ansamblu suport- celule imobilizate cu activitate ridicată de biodegradare și de sinteză a biosurfactanților.

Revendicări: 3
Figuri: 2



**TULPINĂ DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* PRODUCĂTOARE DE
BIOSURFACTANȚI, MEDIU DE CREȘTERE ȘI STIMULARE A ACESTEIA ȘI
PROCEDEU DE BIOAUGMENTARE A PERLITULUI EXPANDAT PENTRU
BIOREMEDIEREA SOLURILOR CONTAMINATE CU HIDROCARBURI**

Invenția se referă la un procedeu de imobilizare în granulele de perlit expandat a celulelor aparținând tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis*, tulpină selectată din soluri contaminate cu hidrocarburi petroliere o lungă perioadă de timp pentru capacitățile biodegradative și de sinteză a biosurfactanților și la un mediu de creștere și stimulare inoculat care saturează spațiul porilor din granulele de perlit expandat, destinat bioremedierii *in situ* sau *ex situ* a solurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere.

Studiile privind comunitățile de microorganisme au constatat faptul că cele imobilizate sunt mai active decât omologii lor liberi, diferențe care se reflectă și în expresia genelor (Mitra și colab., 2016. *AIMS Bioeng.*, 3:44–59; Toyofuku și colab., 2016. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80:7–12), iar în interacțiunea cu materialele suport prezintă modificări fiziologice și de comportament (Abee și colab., 2011. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22:172–179; Smet și colab., 2015. *Int. J. Food Microbiol.*, 208:75–83). Eficiența culturilor libere și imobilizate ale biodegradatorilor de hidrocarburi petroliere a fost evaluată și comparată (WANG și colab., 2012. *Pedosphere*, 22 (5):717-725). Este cunoscută utilizarea ca materiale suport pentru realizarea de preparate microbiene a unor minerale silicatiche anorganice naturale (vermiculit, caolinit, montmorillonitul) (Stotzky G., 1966. *Can. J. Microb.*, 12:1235-1246).

Introducerea absorbantului în solul contaminat este legată și de prezența microorganismelor inoculate capabile să degradeze contaminanți specifici, de tipul hidrocarburilor petroliere, a microorganismelor care tratează contaminanții ca potențiale surse de carbon, astfel încât remedierea să devină mai eficientă și mai rapidă. De asemenea, s-a studiat efectul introducerii nutrienților de azot și fosfor care facilitează creșterea microorganismelor (Wu și colab., 2016. *Int Biodeterior Biodegrad.* 107:158–164; Varjani SJ, 2017. *Bioresour Technol.* 2017; 223:277–286; Kim și colab., 2018. *Sci Total Environ.* 612:903–913), s-a evaluat siguranța mediului la aplicarea de absorbanti pentru bioremedierea solului (Gautam și colab., 2013, *J Environ Chem Eng.* 2014; 2(1): 239-259).

Utilizarea surfactanților microbieni în tehnologiile de mediu a fost analizată, inclusiv a contribuțiilor biosurfactanților la bioremedierea naturală sau indusă (Ławniczak și colab., 2013. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (6):2327-2339); (Pirog T.P., 2015. *Biotechnologia Acta* 8 (4):21-39), bioremedierea cu ajutorul biosurfactanților a contaminărilor cu hidrocarburi (Souza și colab., 2014. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 89:88-94; Rita Silva și colab., 2014. *Intern. J. Molec. Sci.* 15 (7):12523-12542; Bezza și colab., *Process Biochemistry*, 2015, 50 (11):1911-

1922; Bezza și colab., *Chemosphere*, 2016, 144:635-644; Xixi și colab., *International Biodeterioration & Biodegradation* 2018, 132:216-225). Au fost realizate caracterizări și comparații ale biosurfactanților cu surfactanții sintetici în privința eficienței în bioremedierea solului contaminat cu hidrocarburi (Moldes și colab., 2013. *BioMed Res. Intern.*, 1-6), privind tratamentele *ex situ* ale solului contaminat cu hidrocarburi folosind biosurfactanți provenind de la *Lactobacillus pentosus* (Moldes și colab., 2011. *J. Agric. Food Chem.*, 59, (17):9443–9447). De asemenea, a fost studiat rolul agenților tensioactivi produși de microorganisme în facilitarea motilității celulelor pe suprafețe solide, aderența/detașarea pe suprafețe sau biofilme (Rojo F., 2009. *Environ. Microbiol.*, 11:2477–2490), biodegradabilitatea, siguranța ecologică și toxicitatea (Liu și colab., *Mar. Pollut. Bull.*, 2016.107:46-51).

Brevete care descriu procesele de transformare microbiană folosind celule sau sisteme de celule imobilizate (DE3176978D1, EP0303262A3, DE3165230D1, EP0155669A3), suporturi pentru susținerea și utilizarea microorganismelor (JPS63173590A, JPS63229144A), suporturi anorganice pentru bioremediere (US6107067A, US5395808A, US5403799A), formarea biofilmului microbian pe suport poros (US6881445B1, DE19843410650), metode de imobilizare a celulelor microbiene (BE884876A, DE3165230D1, BE884878A, EP0046614B1).

Brevetul US6908753B1 realizează un suport pentru cultura bacteriană în care produsul conține oligoelemente și săruri nutritive pentru creșterea bacteriilor incluse într-un material poros, asigurând numai o densitate ridicată a bacteriilor.

Brevetul US5096814 descrie un suport poros anorganic util pentru imobilizarea celulelor vii de microorganisme utilizat în purificarea reziduurilor sau în producerea biotehnologică a unor substanțe nutritive esențiale. Suportul poros descris a prezentat un volum de 20%-80% pori deschiși, numai macropori cu diametre pînă la 500μm.

Brevetul US5395808 prezintă tot un suport poros anorganic adecvat pentru celulele vii, cum ar fi bacteriile dar diametrul mediu al porilor este între 0,5-100 μm și volumul total al porilor de numai 0,1-1,0 cm³/g. În brevetul DE-OS2839580 se descrie un material suport poros pentru imobilizarea microorganismelor în care peste 70% din pori sunt similari celei mai mici dimensiuni a microorganismelor.

În brevetul WO2000001803A1 se descrie o metodă de utilizare a unor materiale suport poroase de oxid, însă fără macropori, ca materiale suport pentru imobilizarea microorganismelor în bioreactor, a unui compozit și a unui sistem bioreactor-microorganism util în biotratarea contaminanților reziduali. Dezavantajul suportului poros conform invenției îl reprezintă absența substanțială a macroporilor, respectiv a porilor peste 800Å.

În brevetul EP0186125A2 locul suportului convențional pentru atașarea microorganismelor utilizate în diferite reacții microbiologice este luat de filamente realizate însă dintr-o rășină

sintetică cu capacitate mare pentru susținerea celulelor microbiene, eficientă în reacțiile microbiologice dar care poate fi îmbunătățită prin încălzire, prin acoperirea suprafeței suportului cu o plasă sau cu o peliculă perforată. Brevetul US4791061A se referă la o metodă de imobilizare a microorganismelor în granule de poliuretan, polietilen glicol sau poliacrilamidă. Se prezintă formarea de particule care conțin microorganisme protejate de substanțe toxice precum inițiatorul de polimerizare. Dezavantajele sunt legate de imobilizarea redusă, durabilitatea și toxicitatea inițiatorului de polimerizare asupra microorganismelor.

În brevetul US5395808A sunt prezentate produse poroase adecvate utilizării ca suporturi pentru catalizatori, inclusiv celule vii. Suporturile poroase au un diametru mediu semnificativ al porilor de 0,5-100 μ (de la 5 000 până la 1000000 Å) și un volum total de pori 0,1-1,5 cm^3/g , porii mari contribuind la volumul total al porilor cu 0,1-1,0 cm^3/g . Suporturile sunt realizate prin prepararea unui amestec din particule de argilă legată cu unul sau mai mulți lianți anorganici.

Procedeul care face obiectul brevetului US3821086A permite formarea de chelați între celulele microbiene și hidroxizii metalici pentru imobilizarea substanțelor biologice active având suport anorganic, iar US4115198 vizează imobilizarea celulelor întregi și a substanțelor biologice active utilizând acoperirea suportului cu precipitatul unui oxid metalic hidratat și formarea chelaților responsabili de adsorbția acestora. Dezavantajele sunt legate de menținerea contactului direct al populației microbiene imobilizate cu mediul lichid cât și controlul privind caracteristicile precipitatelor.

Deși există studii asupra materialelor suport, privind dezvoltarea unor materiale suport utile, problemele imobilizării microorganismelor nu au fost încă rezolvate, iar aspecte precum densitatea, rezistența, stabilitatea, comportamentul pe termen lung, umectabilitatea și altele asemenea, necesită o continuare a studiilor în domeniu.

Invenția se referă la domeniul biotehnologiei, reprezintă un procedeu de bioaugmentare și biostimulare a unui absorbant anorganic natural de tipul perlitului expandat cu celule de *Candida parapsilosis* tulpina YCP124 pentru utilizare în bioremedierea solurilor contaminate cu petrol în cadrul proiectului PN-III-P2-2.1_PTE-2016-0084, (40-PTE), acronym ECOREMTEH.

Contaminările accidentale de petrol conduc la dezechilibre în sol, la schimbări în raportul C:N, cauzează deficit de N în solurile îmbibate cu petrol, încetinesc creșterea bacteriilor și utilizarea surselor de carbon. În plus, deficiențele de N și diferiți nutrienți (fosforul), pot limita și rata de creștere. Prezența concentrațiilor mari de produse organice biodegradabile în orizontul superior 0-20cm al solurilor agricole scade rezervele de oxigen din sol și reduce viteza de difuzie a oxigenului în straturile mai adânci. Reziduurile petroliere, cu unele variații în compoziție, persistă în sol până la aplicarea măsurilor de bioremediere, însoțite de suplimentări cu oxigen, nutrienți, dintre care azotul și fosforul constituie factori limitativi pentru toate tipurile de

degradare ale petrolului.

Absorbantul natural poros, perlitul expandat, permite curățarea prin absorbție a unor suprafețe mari de sol contaminat puternic, dar poate fi util și în cazul contaminărilor reduse depuse sub forma unor filme subțiri pe componentele structurale ale solului.

Prin bioaugmentarea perlitului expandat el devine un bio-absorbant care cuprinde suportul anorganic cu biodegradatori microbieni imobilizați în matricea acestuia.

În sol, acțiunea bio-absorbantului permite colectarea prin absorbție a poluantului deversat în sol care difuzează spre interiorul granulelor de perlit expandat, devenind sursă de carbon pentru bacteriile imobilizate, sursă unică, care activează metabolismul, intensifică procesele de exudare ale metabolismului secundar bacterian.

Echilibrul față de excesul de carbon este realizat prin bioaugmentare. Astfel este furnizat atât microorganismul capabil dar și stimulat prin realizarea unui raport C:N:P optim proceselor biologice (biodegradare/biosinteză) asigurat de compoziția mediului de creștere și stimulare introdus prin absorbție în perlitul expandat, împreună cu tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis*. Prezența reziduurilor petroliere în sol se reduce prin acțiunea biodegradativă continuă a bio-absorbantului rezolvându-se problema reciclării absorbantului aplicat, aspect deosebit de important deoarece simplifică foarte mult utilizarea lui practică.

În general, pentru combaterea contaminării solurilor, a scurgerilor reziduale în sol, în apa freatică, se produc/aplică produse de absorbție a hidrocarburilor petroliere cu structuri fizico-chimice diferite. Diversitatea mare a tipurilor diferite de absorbanți indică practic subliminal și o nemulțumire a consumatorilor privind calitatea absorbanților cunoscuți și ca urmare preocuparea pentru căutarea unor noi produse care să se apropie de cerințele pieței.

Îmbunătățirea calității absorbanților implicați în bioremediere presupune și o potențare funcțională între anorganic și biologic, potențare care să se reflecte în principal asupra modului în care răspund la cerințe privind capacitatea și eficiența reactivității lor în raport cu poluantul, gradul de hidrofobicitate, rezistența mecanică ridicată, capacitatea de imobilizare a celulelor în raport cu alte materiale suport, nivelul costurilor de imobilizare, reducerea/eliminarea limitărilor de difuzie și a dezactivărilor din timpul imobilizării, capacitatea de încărcare în matricea suport granulară.

Procedeul de imobilizare a celulelor oferă un mijloc rentabil pentru tratarea problemelor existente legate de reziduurile din sol, în special contaminat cu hidrocarburi petroliere, sau pentru eradicarea altor poluanți din sol.

Imobilizarea implică colonizarea cu un microorganism specializat a unui suport ca biofilm stabil și utilizarea suprafețelor colonizate în controlul eficient al proceselor.

Imobilizarea tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* prezintă avantaje privind reducerea

semnificativă a costurilor proceselor de bioremediere, îmbunătățirea eficienței acestora, conservarea simultană a viabilității și a funcțiilor catalitice ale celulelor și ale enzimelor. Prin imobilizare se intensifică biodegradarea contaminanților, utilizarea multiplă a biocatalizatorilor sintetizați, se asigură un micro-mediu stabil pentru celule/enzime, un risc redus de inducere a mutațiilor genetice, o persistență și rezistență la variații ale factorilor de mediu (utilă în condițiile schimbărilor climatice), supraviețuirea în timpul depozitării și o creștere a toleranței față de concentrațiile ridicate ale poluanților în sol, costuri mai reduse prin eliminarea etapelor tehnice de filtrare a celulelor, limitarea mobilității celulelor microbiene și a enzimelor. Utilizată în procesele de bioremediere, imobilizarea celulelor tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* prin adsorbție se bazează pe interacțiunea fizică cu suprafața suportului, este rapidă, simplă, ecologică și rentabilă. Adsorbția realizează formarea de legături slabe și din această cauză, celulele microbiene se pot detașa de suport și pot trece și în microhabitatul adiacent din sol.

Materialul suport adecvat pentru imobilizarea tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* trebuie să fie netoxic, să prezinte o suprafață mare, neregulată. Această matrice ar trebui să fie hidrofilă și foarte poroasă pentru a promova aderența și proliferarea celulelor. Porozitatea suportului are importanță deosebită în imobilizarea microorganismelor (prin parametri precum gradul de porozitate și mărimea porilor), astfel încât gradul de adecvare al suportului pentru imobilizarea celulelor se reflectă în conținutul mare al macroporilor cu diametru mai mare decât dimensiunea microorganismului.

Macroporii sunt considerați esențiali în materialul suport anorganic natural pentru imobilizarea adecvată a celulelor vii, deoarece rata de difuzie și gradul de susținere a microorganismelor în pori crește odată cu creșterea diametrului. Difuzia intragranulară influențează viteza reacțiilor catalizate, utilizarea unui suport cu pori mari determinând o creștere a intensității și a vitezei reacțiilor metabolice.

Prezența celulelor vii în macropori este considerată necesară în promovarea populațiilor mari prin suprafața suplimentară disponibilă pentru colonizare. Cu cât concentrația lor în suportul anorganic este mai mare, prin densitatea celulelor vii, cu atât este mai mare activitatea catalitică a biomasei imobilizate. Mai mult, celulele din porii suportului anorganic sunt protejate de suprasolicitările tranzitorii din mediul extern prin ratele lente de difuzie între micropori.

Suportul cu dimensiuni mari ale porilor prezintă dezavantaje care includ menținerea integrității fizice, a stabilității dimensionale, dificultățile privind costurile de procesare și oferta dimensională limitată.

În consecință, există necesitatea unor suporturi poroase, anorganice, naturale pentru imobilizarea celulelor vii, valorificată în cadrul invenției, care să suporte activități biocatalitice comparabile sau mai mari decât cele atribuite suporturilor anorganice cu volum mare al

macroporilor, dar care să nu sufere de dezavantajele asociate acestora.

Materialul anorganic poros natural, reprezentat de perlitul expandat, atunci când este colonizat cu microorganismul selectat, prezintă o productivitate ridicată a biocatalizatorilor comparabilă cu materialele comerciale suport care conțin macropori suficient de mari pentru a asigura prezența acestora.

Este cunoscută utilizarea ca material suport pentru realizarea preparatelor microbiene a diverselor minerale silicatiche anorganice naturale, cum ar fi vermiculitul, caolinitul sau montmorillonitul. Calitatea materialelor de acest tip poate varia foarte mult și, în plus, prezența/inducerea în compoziția acestora a compușilor cu rol inhibitor pentru componenta microbiană, cauzează probleme în realizare de produse care conțin microorganisme imobilizate pe astfel de suporturi.

Materialul suport utilizat în cadrul invenției, reprezentat de perlitul expandat, are rol de protecție a celulelor vii imobilizate față de variațiile factorilor din sol, (temperatură, pH, UV, antioxidanți, agenți antimicrobieni etc.). Proprietățile perlitolui expandat sunt mult apropiate celor necesare unui material suport pentru tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* și includ condițiile aerobe, microaerobe și anaerobe din interiorul granulelor, suprafață specifică internă adecvată, o bună capacitate de tamponare, de adsorbție și un pH neutru.

Perlitolul expandat, cu aspect comercial granulat, prezintă proprietăți speciale (uniformitate fizică și chimică, capacitate de reținere a apei, netoxic, prietenos mediului) în calitate de suport optim pentru inoculanți, mai bune decât vermiculitul, iar supraviețuirea și intensitatea proceselor fiziologice ale celulelor vii imobilizate poate fi îmbunătățită prin adăugarea de nutrienți.

În general, microorganismele edafice, bacterii/funghi, au fost utilizate pentru îndepărtarea hidrocarburilor petroliere din solurile contaminate ca microorganisme libere sub formă de inocul (1) prin amestec direct cu solul și fără o separare între microorganisme și solul tratat sau (2) microorganismele pot fi imobilizate (în materiale suport, încapsulate), ca în cazul invenției, unde există o separare distinctă între microorganisme și solul tratat.

În cadrul invenției, a fost preferată imobilizarea pe suport deoarece utilizarea în practică a inoculărilor cu microorganisme libere care pot fi amestecate direct cu solul determină schimbări în structura comunităților microbiene indigene, influențează competițiile trofice și interacțiunile antagoniste/sinergice cu populațiile microbiene rezidente, prin cantitatea sau combinația de inoculanți nu se produc mereu efecte aditive/sinergice ale acțiunii lor, se pot induce perturbări tranzitorii ale echilibrului comunităților microbiene din sol, schimbări în compoziția microbiană prin pierderea unor specii native, influențe asupra nivelului diversității și al interacțiunilor în sistemul biotă-sol-plantă, apar modificări funcționale de ansamblu ale sistemului datorită redundanței și determină adaptare datorată expunerii prelungite a comunităților microbiene.

Aplicarea în practică a celulelor imobilizate este considerată mai eficientă decât cea cu celulele libere, deoarece conduce la o încărcare mai mare cu biomasă, la operarea mai ușoară prin separările solid-lichid, prin rate mai mari de biodegradare, printr-o funcționare mai stabilă, o protecție mai mare față de substanțele toxice, iar genetic printr-o stabilitate crescută a plasmidelor celulare.

Alte materiale suport de tip lignocelulozic, ceramic, polimeri naturali sau sintetici utilizați induc celulelor imobilizate un potențial imens de a elimina o gamă largă de poluanți, inclusiv compuși fenolici, coloranți organici, etc., dar și de utilizare a nutrienților precum azotul și fosforul din mediul adiacent.

Procesul integrat de asimilare, adsorbție și biodegradare reprezintă mecanismul unic responsabil în bioremedierea solurilor contaminate prin intermediul microorganismelor.

Celulele tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* prezintă caracteristici care le favorizează în condițiile utilizării lor prin imobilizare în perlitul expandat. Culturile genului *Candida*, în general, se adaptează și rezistă ușor proceselor industriale care utilizează una/mai multe transformări biochimice. Tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* este capabilă de degradare și sinteză, poate fi imobilizată pe un suport anorganic natural, cu o compoziție constantă și bine definită și în care procesele biochimice pot fi optimizate/intensificate prin aportul mediului de creștere și stimulare. Mediul lichid pentru creștere și stimulare este un complex de nutrienți, complex prin care se elimină necesitatea unor soluții suplimentare. Celulele aparținând tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* au un comportament constant și specific în domeniul determinărilor biochimice privind cererea de oxigen (BOD) în condițiile utilizării hidrocarburilor ca sursă de carbon în mediul lichid de creștere și stimulare.

Celulele tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* imobilizate pe suportul anorganic natural (perlit expandat) sunt stabilizate prin adsorbția internă. Stabilitatea și variațiile acesteia au fost analizate prin evaluări privind viabilitatea, caracteristicile biochimice și de creștere standard, susceptibilitatea la xenobiotice, inclusiv modul de stocare pe termen lung.

Stabilitatea legăturilor dintre celulele tulpinii YCP124 și suport se explică prin interacțiunile favorabile din soluția de creștere și stimulare la interfețele celulă-soluție și celulă-suport. Interacțiunile fac ca încărcarea să fie favorabilă, iar acest comportament se explică probabil prin condițiile de imobilizare și funcționalitate alese, prin proprietățile membranare în raport cu încărcarea de suprafață a suportului în intervalul funcțional de pH.

În timpul producerii, transportului și stocării, inoculantul imobilizat răspunde prin capacitatea de a suporta rate de supraviețuire față de o serie de factori de stress (aciditate, uscare, xenobiotice, temperaturi nefavorabile) comportându-se bine sub influența acestor factori.

Hidrocarburile au devenit acum o categorie foarte importantă de substraturi pentru

oxidarea microbiană. Soarta biologică a hidrocarburilor în sol, în condiții ideale, duce la mineralizarea completă până la dioxid de carbon, apă și o producție de biomasă sau la o biodegradare incompletă. Metabolizarea în produse parțial oxidate servește, de asemenea, la remedierea solului contaminat prin fixarea și stabilizarea materialelor potențial periculoase. Hidrocarburile parțial degradate pot fi încorporate în materia organică a solului. Pentru o biodegradare eficientă, este esențial ca substratul de hidrocarburi să fie "biodisponibil" pentru comunitățile microbiene degradante din sol.

Majoritatea hidrocarburilor petroliere sunt hidrofobe și limitează capacitatea microorganismelor de a le accesa și degrada, deoarece acestea se dezvoltă în medii aflate preponderent în fază apoasă, dar totuși ele pot depăși acest obstacol prin producerea de biosurfactanți care facilitează emulsificarea hidrocarburilor. Agenții tensioactivi produși au și rol în facilitarea motilității celulelor pe suprafața solidă a suportului, a aderenței/detașării pe suprafețe/biofilme, astfel exteriorul plasmalemei celulare ajunge hidrofob și permite contactul celular cu hidrocarburile din sol, în timpul biodegradării.

Prin biostimulare sunt modificați parametrii fizici și chimici ai solului și procesul de bioremediere este accelerat după introducerea de compuși de tipul nutrienților sau acceptorilor de electroni. Avantaje nu depășesc dezavantajele metodei, cum ar fi costurile ridicate și riscurile privind dispersarea contaminantului.

Procesul de biostimulare, în general, implică adăugarea în solurile poluate a nutrienților sub formă de îngrășăminte organice și/sau anorganice, pentru a stimula activitatea și proliferarea microbiotei indigene. Dar prin această abordare se poate decela greu în ce măsură și cu ce eficiență se direcționează activitățile biodegradative care vizează hidrocarburile poluante ca sursă principală de hrană. Cu toate acestea, se presupune că hidrocarburile sunt degradate mai rapid în comparație cu procesele de atenuare naturală, probabil din cauza numărului crescut de microorganisme stimulate de cantitatea mai mare de nutrienți furnizate solului contaminat.

În cazul imobilizării celulelor tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* în perlitul expandat, mediul de creștere cuprinde suplimentar componentele de stimulare, asigurând metabolismului celular rezerve bogate de azot și fosfor, un raport C/N/P optim procesului biodegradativ și de sinteză a biosurfactanților. Mediul modificat este înglobat în perlitul expandat simultan cu tulpina microbiană adusă la o abundență care să permită o imobilizare eficientă prin valorificarea suprafețelor de aderență a pereților micro- și macroporilor interni ai granulelor de perlit expandat. Utilizarea biosurfactanților produși de tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* imobilizată pentru amplificarea efectului biodegradativ și eficientizarea bioremedierii solurilor poluate se încadrează în tiparul abordărilor emergente concentrate pe utilizarea și pe aplicarea acestora pentru restabilirea sănătății solului și îmbunătățirea producției

agricole într-un mod durabil.

Problema pe care o rezolvă invenția de față constă în bioaugmentarea unui material poros anorganic natural cu o tulpină capabilă de biodegradare și sinteză de biosurfactanți, dezvoltată într-un mediu care stimulează utilizarea hidrocarburilor ca sursă de carbon.

Tulpină de *Candida parapsilosis*, YCP124, depozitată la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 27.08.2018, conform cerințelor tratatului de la Budapesta, cu numărul P1554, caracterizată prin aceea că pe mediul YPGA prezintă colonii convexe, netede, de culoare albă-crem, lucioase, cu margini întregi, rotunde, celule ovale până la rotunde, 2,5-5,5μm, cu înmugurire polară, nu formează hife/pseudohife, urează negativă, produce EPS, crește pe mediul MRS agar, este izolată din sol contaminat cu hidrocarburi petroliere și prezintă capacitate biodegradativă a hidrocarburilor și de sinteză a biosurfactanților. Tulpina a fost capabilă să utilizeze kerosen, motorină și țiței, ca surse de carbon și să producă biosurfactanți. Eficiența activității degradative a fost cea mai ridicată la kerosen (87,36%) și a produs 10,4 g/L de biosurfactant.

Mediu de creștere și stimulare a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* definită în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că are următoarea compoziție: glucoză 1g/L, acetat de sodiu 1g/L, oxaloacetat 1g/L, citrat de amoniu 5g/L, sulfat de amoniu 5g/L, clorură de amoniu 8g/L, fosfat monopotasic 5g/L, clorură de calciu 0,1g/L, clorură de sodiu 0,1g/L, clorură ferică 200μg/L, sulfat de magneziu 500μg/L, sulfat de zinc 400μg/L, sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20min, iar după sterilizarea mediului se adaugă cisteină 50mg/L, metionină 50mg/L, biotină 2μg/L, riboflavină 200μg/L sterilizate prin filtrare (45μm), pH-ul final al mediului de 5,5; inoculul (1%, v/v) adăugat la mediul răcit a avut o densitate de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml.

Procedeu de bioaugmentare a perlitului expandat cu tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* definită în revendicarea 1 și crescută pe mediul de creștere și stimulare definit în revendicarea 2, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: a) sterilizarea termică a perlitului cu granulațiile de 4mm (max.5%<0,5mm), cu densitate în grămadă în stare afânată 70 kg/m³, timp de 60min la 650°C; b) introducerea perlitului expandat în bioreactor la atingerea temperaturii de 45°C; c) realizarea mediului de creștere/stimulare; d) sterilizarea prin autoclavare la 121°C, timp de 15 min la 1,2 atm a mediului; e) inocularea tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis*, reprezentând 1% din compoziție, în mediul de creștere/stimulare; f) incubarea la 28°C, agitare 150rpm, timp de 48h, obținându-se cultura cu densitatea de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml; g) bioaugmentarea și biostimularea perlitului expandat prin imersia în această cultură, cu un volum de 2,2 ori mai mare decât greutatea perlitului; h) presurizarea la 6,5atm timp de 30min; i) transvazarea perlitului expandat bioaugmentat și biostimulat j) incubarea la

28°C a perlitului expandat bioaugmentat și biostimulat pentru 48h; k) uscarea în flux de aer la 25°C, 30min și ambalarea în pungi sterile de polietilenă de 1Kg; l) conservarea optimă la 4°C timp de 120zile.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- tulpina utilizată în cadrul procedurii este nouă, nu este modificată genetic și prezintă o relativă stabilitate genetică;
- permite o bună imobilizare în perlit expandat a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* fără utilizarea agenților de reticulare sau hidrofobicizare;
- celulele imobilizate prezintă un grad ridicat de viabilitate, capacitate crescută de reținere și de reacție enzimatică, de reproducere într-un mediu adecvat;
- un volumul de mediu mai mic în cazul procedurii de imobilizare a celulelor decât în cazul metodelor convenționale;
- utilizează un mediu lichid pentru creșterea și stimularea celulară format dintr-un complex de nutrienți, astfel eliminând necesitatea unor soluții suplimentare;
- nu implică microorganisme suplimentare inoculate pentru a furniza azot și fosfor mineral;
- se reduc costurile de imobilizare în suportul anorganic, nefiind necesare pre-tratamente (soluții) sau post-tratamente (încapsulare);
- este ecologică acționând eficient, prin caracteristicile ansamblului suport-celule imobilizate, pentru stabilizarea contaminatului, biodegradarea și împiedicarea scurgerilor acestuia;
- se reduc/elimină limitările de difuzie și dezactivările care apar în timpul imobilizării celulelor;
- nu necesită intervenții suplimentare asupra perlitului expandat în condițiile unei evoluții spre condiții de mediu microaerofil în granulele de perlit și în sol, induse de factorii de mediu;
- permite biodegradarea hidrocarburilor din sol prin utilizarea unui material absorbant care poate rămâne în sol pe o perioadă nedefinită;
- permite manipulări atât în condiții *in situ* cât și *ex situ* datorate rezistenței mecanice ridicate asigurată ansamblului de tip bio-suport;
- prin imobilizarea celulelor în perlit expandat, biosurfactanții sintetizați permit o valorificare eficientă a resurselor energetice adiacente, nu afectează solul datorită biodegradabilității mari, toxicității scăzute și prezintă siguranță ecologică;
- creșterea biodiversității în sol prin utilizarea energiei libere generată de prezența în microhabitat a substratului hidrocarbonat și generarea metaboliților secundari valorificabili de alte microorganisme;

- prin sinteza biosurfactanților se constituie ca parte în procesele de bioremediere oferind mecanismul de mobilizare a contaminanților din sol și creșterea accesibilității lor pentru populațiile microbiene;
- optimizează procesele de bioremediere asigurându-se tamponarea parametrilor operaționali din sol astfel încât nici unul să nu devină factor limitativ în timpul desfășurării proceselor biodegradative;
- nu implică liofilizări pentru menținerea culturilor, evitându-se posibile mutații/contaminări, aerosolizarea organismelor viabile din culturile liofilizate, necesitatea unui echipament costisitor și nevoia de personal tehnic;
- promovează în mod semnificativ procesele de bioremediere, reduce costurile acestora și asigură condiții funcționale biocatalizatorilor.

Figura 1 a reprezintă tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* în cultură pură

Figura 1 b reprezintă tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* - aspectul coloniilor pe mediul YPGA

Figura 1 c reprezintă tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* – aspectul celulelor

Figura 1 d colonie tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* pe mediu BH cu 1% petrol

Figura 1e reprezintă evaluarea capacităților biodegradative ale tulpinilor testate (1% kerosen, 28 zile)

Figura 1f reprezintă evaluarea calitativă a capacităților de sinteză a biosurfactanților de către tulpinile testate.

Figura 1g reprezintă aspectul emulsiilor cu Tween 80 (martor) și a biosurfactanților produși de tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* cu kerosen, motorină și petrol.

Figura 2a Evidențierea prin fluorescență a nivelului activității biologice din perlitul expandat cu granulații de 0,5-1mm, 2-3,4mm, 4-5mm și bioaugmentat cu tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* la o densitate în mediu de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml.

Figura 2b Numărul cel mai probabil de celule libere din spațiul intergranular

Figura 2c Nivelul potențial de respirație al celulelor tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* imobilizate în perlitul expandat cu granulații de 0,5-1mm, 2-3,4mm și 4-5mm.

Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple.

EXEMPLUL 1

Privind selecția tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis*, cu origine edafică, din soluri contaminate o lungă perioadă de timp cu hidrocarburi petroliere și având atât capacități biodegradative cât și de sinteză a biosurfactanților.

Au fost izolate și selectate microorganisme edafice aparținând genului *Candida* care provin din soluri contaminate de o lungă perioadă de timp cu produse petroliere. Tulpinile provin din

soluri evaluate sub aspectul încărcării cu reziduu petrolier total având grade de poluare foarte slab (0,1-0,2%), mediu (0,5-1%) și puternic (1-1,5%) și care aparțin la 3 tipuri de sol.

Principalele caracteristicile fizico-chimice ale solurilor pe adâncimea 0-20cm sunt pentru Aluviosol, o încărcare foarte slabă de reziduu petrolier total (0,165%), pH-7,2, un conținut de humus de 1,37%, fosfor 7,3ppm, săruri 0,054%, pentru Erodisol, cu încărcare medie de reziduu petrolier total (0,625%), pH-5,6, un conținut de humus de 1,62%, fosfor 4,0ppm, săruri 0,024%, și pentru Preluvosol, cu încărcare puternică de reziduu petrolier total (3,924%), pH-6,4, un conținut de humus de 3,65%, fosfor 2,9ppm, săruri 0,070%.

Au fost izolate 17 de tulpini, s-au realizat culturi de îmbogățire pe mediu YPG lichid, incubate la 28°C pentru 72h. Culturile obținute au fost păstrate pe mediu YPG și MRS agarizat la 4°C.

Toate cele 17 de tulpini nemodificate genetic au fost testate pentru capacitatea de utilizare a hidrocarburilor și de sinteză a biosurfactanților. Capacitatea de utilizare a hidrocarburilor de către tulpinile selectate a fost evaluată calitativ pe baza activității dioxigenazice prin reacția de culoare a coloniilor crescute cu indol inclus în plăci cu mediu mineral agarizat și a activității catecol 2,3 dioxigenazice prin reacția de culoare a coloniilor crescute cu catecol inclus în plăci cu mediu mineral agarizat. Capacitatea de sinteză a biosurfactanților de către tulpinile selectate a fost evaluată calitativ prin teste de distorsiune optică pe microplăci (Figura 1f)

Pe baza rezultatelor obținute în urma analizelor calitative și cantitative a fost selectată tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* care au prezentat cea mai ridicată capacitate biodegradativă (87,36%) cât și de sinteză a biosurfactanților (10,4 g/L)

Tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* a fost izolată din Erodisol contaminat cu 0,625% hidrocarburi, din județul Olt. pH-5,6, un conținut de humus de 1,62%, fosfor 4,0ppm, săruri 0,024%,

Încadrarea taxonomică a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* este Filum Ascomycota, Subfilum Saccharomycotina, Clasa Saccharomycetes, Ordinul Saccharomycetales, Familia Saccharomycetaceae, Genul *Candida*, Specia *Candida parapsilosis* Langeron & Talice(1932), Sinonim cu *Mycocandida parapsilosis* C. W. Dodge (1935), *Mycotorula parapsilopsis* Cif. & Redaelli (1943), *Candida quercus* Montrocher & Claisse (1984).

Descriere: Tulpina YCP124 (Fig. 1a) este depozitată cu numărul P1554 la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 27.08.2018, conform cerințelor tratatului de la Budapesta.

Coloniile dezvoltate pe mediul YPGA la 28°C sunt convexe, netede, de culoare albă-crem, lucioase, cu margini întregi, rotunde (Fig.1b).

La microscopul optic prezintă celule ovale până la rotunde, 2,5-5,5 μ m, cu înmugurire polară și nu formează hife/pseudohife (Fig.1c).

Tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* nu produce urează, produce exopolizaharide (EPS), poate crește pe mediul MRS agar.

Capacitatea de asimilare a carbonului de către tulpina YCP124 (pe mediul Barnett) a fost evaluată, la intervale de 3-28 de zile, cu următoarele rezultate: D-glucoză (+), D-galactoză (+), D-sorboză (+/-), D-xiloză (+/-), Sucroză (+), α -Trehaloxă (+), Celobioză (+), Rafinoză (+/-), Glycerol (s/-), 2-Keto-D-glucoză (+/-), Citrat (+) și a azotului, pentru L-Lizină (+).

Capacitatea de asimilare anaerobă a carbohidraților (2%), la 21 zile, s-a determinat pentru D-glucoză (+/-), D-galactoză (+/-). Au fost realizate teste suplimentare de caracterizare a tulpinii privind formarea amidonului (-), hidroliza ureii (-), sensibilitatea la cicloheximidă 0,01% (-) și 0,1% (-), testele cu diazonium blue B pe YBN agar (-), pentru proteinază (-), pe mediu YBN conținând 0,5% glucoză, 0,5% cazeină, pH 7,0, incubare 7 zile.

Tulpina a fost capabilă să producă biosurfactanți și să crească pe sursele de carbon studiate, respectiv kerosen, motorină și țiței (Figura 1d). La utilizarea kerosenului tulpina a avut cea mai eficientă activitate degradativă (87,36%) (Figura 1e) și a produs cele mai mari cantități de biosurfactant (10,4g/L). În cazul utilizării motorinei și țițeiului de către tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* activitatea degradativă a fost de 74,82% și respectiv 61,54% și a produs 7,2g/L și respectiv 5,82g/L biosurfactant. Biosurfactanții sintetizați au fost capabili să emulsioneze hidrocarburile testate (Figura 1g). Tween 80 a fost utilizat ca surfactant sintetic pentru referință și control. S-a determinat pH-ul și stabilitatea biosurfactantă în mediu acelular după 48h de incubare.

Condiții de cultivare: pe mediile YPGA (extract de drojdie 5g/l, peptonă 10g/l, glucoză 20g/l, agar-agar 20g/l), Merk și pe MRS (De Man Rogosa-Sharpe) lichid, Liofilchem (ISO15214) 54,3g/l, pH 6,2, autoclavate 15 min. la 121°C.

Condiții de depozitare: Culturi pure în eprubete cu mediile YPGA și MRSA solide înclinate, la 2-5°C (Fig. 1a)

Condiții de testare a viabilității: Incubare pe mediul de cultură YPG lichid, 48h la 28°C.

EXEMPLUL 2

S-a evaluat influența mărimii granulelor de perlit expandat, a concentrației inoculului asupra imobilizării celulare.

Perlitul expandat utilizat ca suport natural anorganic pentru imobilizarea celulelor are culoare albă, este dur și foarte poros, cu densitate 0,9g/cm³, umiditate 0,3%, pH 7,2, indice de refracție 1,5, conductivitatea termică la 24°C 0,04-0,06 W/m²K, insolubil în apă, conține apă legată 3%. Compoziția chimică cuprinde dioxid de siliciu 74-77%, oxid de aluminiu 12-15%,

oxid de sodiu și potasiu 5-8%, oxid de fier 1,1-1,6%, oxid de calciu 1,3-1,7%, oxid de magneziu 0,1-0,7%, microelemente 0,1-0,2%.

Datorită rețelei capilare interne puternice perlitul poate reține de câteva ori greutatea sa în apă. Diferența în capacitatea de reținere a apei între fracțiunile grosiere și fine arată că apa este reținută de particulele grosiere prin volumul porozității interne.

După hidratarea prin imbibare urmată de uscarea termică a perlitului expandat la 650°C s-a determinat conținutul de apă disponibil (26,5-33.2%) pentru granulele de 0,5-1mm, saturația în apă a fost foarte rapidă, independent de umiditatea inițială. Pentru granule de 2-3,5mm conținutul de apă disponibil a fost de 36,5-43.2% cu o saturație în apă lentă și de 45-50% pentru granule de 4-5mm cu o saturație în apă foarte lentă (60min).

Concentrația optimă a mediului de creștere/stimulare în celule aparținând tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* a fost determinată prin imersia granulelor de perlit cu dimensiuni diferite (0,5-1mm, 2-3,5mm, 4-5mm) și de vermicompost în mediul cu densități diferite de celule viabile/ml ($8,9 \times 10^3$; $87,5 \times 10^3$; $15,8 \times 10^4$). Perlitul expandat utilizat ca suport anorganic natural cuprinde grupări oxid/hidroxid, disponibile, care permit o bună adsorbție. După transvazarea perlitului din mediul de imersie, incubare la 28°C pentru 48h, s-a determinat calitativ nivelul activității biologice a celulelor imobilizate prin intensitatea exometabolismului secundar (evidențiată prin utilizarea acridinei ca fluorocrom) (Figura 2a) și cantitativ s-a determinat numărul cel mai probabil de celule libere, detașabile în spațiul intergranular (Figura 2b) și nivelul potențial de respirație pentru activitatea globală (Figura 2c). Datele prezentate sunt valori medii ale determinărilor având trei repetiții, au fost analizate statistic pentru $P < 0,05$.

Nivelul cel mai crescut al activității biologice din perlitul expandat s-a observat în granulele de 4-5mm, bioaugmentate cu tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* având în mediu densitatea de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml. Numărul cel mai probabil de celule libere crescut în spațiul intergranular s-a determinat în prezența granulelor de 0,1-1mm ($1,8 \times 10^2$ celule viabile/ml) și cel mai scăzut la granulele de 4-5mm ($0,6 \times 10^2$ celule viabile/ml). Nivelul potențial de respirație al celulelor tulpinii YCP124 de *C. parapsilosis* imobilizate a fost cel mai ridicat la perlitul expandat de 4-5mm (67,34mg CO₂/100g s.u).

EXEMPLUL 3

S-a evaluat influența compoziției mediului de creștere/stimulare asupra capacității tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* de biodegradare și de sinteză a biosurfactanților.

Perlitul expandat utilizat ca suport natural anorganic pentru imobilizarea celulelor prezintă caracteristici prezentate în Exemplul 2. Compoziția chimică este similară cu cea expusă la Exemplul 2.

Pentru bioaugmentare și biostimulare 4,5kg perlit expandat de 4-5mm a fost introdus în

mediul lichid din bioreactor, într-o cantitate de lichid de 2,2 ori mai mare decât greutatea perlitului, concentrația inoculului (1%, v/v).

Mediul lichid din bioreactor utilizat pentru bioaugmentare și biostimulare a avut următoarele variante de compoziții:

Varianta A: glucoză 0,1g/L, acetat de sodiu 0,1g/L, oxaloacetat 0,1g/L, citrat de amoniu 0,5g/L, sulfat de amoniu 0,5g/L, clorură de amoniu 0,8g/L, fosfat monopotasice 0,5g/L, clorură de calciu 0,01g/L, clorură de sodiu 0,01g/L, clorură ferică 20μg/L, sulfat de magneziu 50μg/L, sulfat de zinc 40μg/L. Mediul a fost sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20min. După sterilizarea mediului se adaugă cisteină 5mg/L, metionină 5mg/L, biotină 2μg/L, riboflavină 20μg/L sterilizate prin filtrare (45μm), pH-ul final al mediului de 6,5.

Varianta B: glucoză 1g/L, acetat de sodiu 1g/L, oxaloacetat 1g/L, citrat de amoniu 5g/L, sulfat de amoniu 5g/L, clorură de amoniu 8g/L, fosfat monopotasice 5g/L, clorură de calciu 0,1g/L, clorură de sodiu 0,1g/L, clorură ferică 200μg/L, sulfat de magneziu 500μg/L, sulfat de zinc 400μg/L. Mediul a fost sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20min. După sterilizarea mediului se adaugă cisteină 50mg/L, metionină 50mg/L, biotină 2μg/L, riboflavină 200μg/L sterilizate prin filtrare (45μm), pH-ul final al mediului de 5,5.

Varianta C: glucoză 10g/L, acetat de sodiu 10g/L, oxaloacetat 10g/L, citrat de amoniu 15g/L, sulfat de amoniu 15g/L, clorură de amoniu 18g/L, fosfat monopotasice 15g/L, clorură de calciu 1g/L, clorură de sodiu 1g/L, clorură ferică 2mg/L, sulfat de magneziu 5mg/L, sulfat de zinc 4mg/L. Mediul a fost sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20min. După sterilizarea mediului se adaugă cisteină 500mg/L, metionină 500mg/L, biotină 20μg/L, riboflavină 2mg/L sterilizate prin filtrare (45μm), pH-ul final al mediului de 5.

După incubare la 28°C pentru 48h concentrația optimă a celulelor tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* în mediul pentru imersia granulelor de perlit a fost de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml, în cazul variantei B. Capacitatea biodegradativă a tulpinii pe mediile testate s-a determinat după 28 de zile utilizând 1% petrol ca sursă de hidrocarburi iar indicele de emulsifiere E24 s-a determinat utilizând motorină și mediu în părți egale, conform metodologiei standard. De asemenea, rata de creștere și timpul mediu per generație prezintă valori care diferă semnificativ între variantele de mediu (Tabel 1).

Tabel 1 Influența compoziției mediului asupra parametrilor biologici

Varianta de mediu	Biodegradarea	Indice de emulsifiere (E24)	Timpul mediu/generație	Rata de creștere
	%	%	zi	zi
A	63.35 c	56.8 c	1.52 b	0.41 b
B	74.82 a	64.2 a	1.44 c	0.48 a
C	68.46 b	61.4 b	1.65 a	0.38 c

Datele reprezintă media a trei repetiții. Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru, P<0,05, test Student

EXEMPLUL 4

S-a evaluat influența condițiilor de mediu asupra celulelor immobilizate. Perlitul bioaugmentat/biostimulat conform exemplului 3 este transvazat din bioreactor și incubat la temperaturi diferite (25°C, 28°C, 35°C) pentru perioade diferite de timp (24h, 48h, 72h). După incubare, toate au fost uscate la 25°C, 30min.

S-a testat vitalitatea (Tabel 2) prin colorare fluorescentă cu acridin oranj (% celule colorate) și viabilitatea în timp a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* cu MTT la 570nm, pentru o perioadă de 120 de zile, menținând la 4°C granulele ambalate în pungi sterile de polietilenă de 1kg.

Temperatura optimă pentru incubare a fost de 28°C, timp de 48h (Tabel 2).

Tabel 2 Vitalitatea celulelor aparținând tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* în condiții diferite de mediu (% celule viabile)

Temperatura	Timp			
	24h	48h	72h	X
25°C	64.34±3.6	74.24±2.3	69.44±3.6	69.34±3.1
28°C	87.73±4.2	97.65±3.6	90.83±2.2	94.4±3.3
35°C	79.83±3.0	83.56±2.3	79.67±3.8	81.02±3.0

Rezultatele demonstrează faptul că tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* este immobilizată eficient în perlit expandat cu granulație de 4mm în comparație cu alte materiale poroase anorganice, nu utilizează agenți de reticulare sau hidrofobicizare, nu necesită pre-tratamente sau post-tratamente; păstrează capacitățile biodegradative și de sinteză a biosurfactanților, prezintă un grad ridicat de viabilitate al celulelor immobilizate, mediul lichid pentru bioaugmentare și stimulare celulară elimină necesitatea unor soluții suplimentare sau microorganisme în furnizarea de azot și fosfor mineral, procedeul nu implică liofilizări, evită mutații/contaminări, permite biodegradarea hidrocarburilor din sol prin utilizarea materialului absorbant care poate rămâne în sol pe o perioadă nedefinită, permite manipularea *in situ* și *ex situ*, oferă un mecanism de mobilizare a contaminanților din sol și de creștere a accesibilității lor pentru populațiile microbiene; funcționează în condiții de mediu microaerob indus de factorii de mediu; reduce/elimină limitările de difuzie și dezactivările din timpul immobilizării celulelor, crește biodiversitatea în sol utilizând energia liberă generată de prezența în microhabitat a substratului hidrocarbonat și generează metaboliți secundari valorificabili de alte microorganisme, biosurfactanții sintetizați valorifică eficient resursele energetice adiacente, nu afectează solul datorită biodegradabilității mari, toxicității scăzute, prezintă siguranță ecologică; stabilizează contaminații, intensifică biodegradarea și împiedică scurgerile, asigură condiții funcționale biocatalizatorilor, promovează procesele de bioremediere și reduce costurile acestora.

Tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* immobilizată în perlit expandat poate fi utilizată și în producerea la scară largă a biosurfactanților, cu costuri mai mici de producție, pentru diverse

utilizări.

Procedeul de imobilizare și stabilizare în perlit a celulelor poate fi aplicat pentru alte tulpinii de drojdii și bacterii cu abilități metabolice deosebite, permițând și o valorificare a enzimelor intracelulare cu activitate ridicată, a enzimelor instabile și a enzimelor care catalizează reacții secundare.

Procedeul de imobilizare în perlit a celulelor poate fi aplicat și pentru valorificarea altor substraturi sau a produselor cu masă moleculară mică.

Prin aplicarea în industria bazată pe procesări fermentative a procedurii de imobilizarea a celulelor pe suport solid anorganic, se pot obține creșteri ale concentrației și reduceri ale timpului de procesare.

În domeniul nutriției umane, aplicarea procedurii de imobilizare ar permite sinteza de nutriceutice, spre exemplu prin utilizarea lipazelor produse, care pot fi izolate și încorporate în alimentele obișnuite.

În producția de cidru celulele imobilizate pot fi implicate mai eficient în fermentările alcoolice, în îmbunătățirea controlului fermentărilor și al producției de componente aromatizante.

REVENDICĂRILE

- Tulpină de *Candida parapsilosis*, YCP124, depozitată la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 27.08.2018, conform cerințelor tratatului de la Budapesta, cu numărul P1554, caracterizată prin aceea că pe mediul YPGA prezintă colonii convexe, netede, de culoare albă-crem, lucioase, cu margini întregi, rotunde, celule ovale până la rotunde, 2,5-5,5 μ m, cu înmugurire polară, nu formează hife/pseudohife, nu produce urează, produce EPS, crește pe mediul MRS agar, este izolată din sol contaminat cu hidrocarburi petroliere și prezintă capacitate biodegradativă a hidrocarburilor și de sinteză a biosurfactanților.

- Mediu de creștere și stimulare a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* definită în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că are următoarea compoziție: glucoză 1g/L, acetat de sodiu 1g/L, oxaloacetat 1g/L, citrat de amoniu 5g/L, sulfat de amoniu 5g/L, clorură de amoniu 8g/L, fosfat monopotasnic 5g/L, clorură de calciu 0,1g/L, clorură de sodiu 0,1g/L, clorură ferică 200 μ g/L, sulfat de magneziu 500 μ g/L, sulfat de zinc 400 μ g/L, sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20min, iar după sterilizarea mediului se adaugă cisteină 50mg/L, metionină 50mg/L, biotină 2 μ g/L, riboflavină 200 μ g/L sterilizate prin filtrare (45 μ m), pH-ul final al mediului de 5,5; inoculul (1%, v/v) adăugat la mediul răcit a avut o concentrație de 15,8x10⁴ celule viabile/ml.

- Procedeu de bioaugmentare a perlitului expandat cu tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* definită în revendicarea 1 și crescută pe mediul de creștere și stimulare definit în revendicarea 2, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: a) sterilizarea termică a perlitului cu granulațiile de 4mm (max.5%<0,5mm), cu densitate în grămadă în stare afânată 70 kg/m³, timp de 60min la 650°C; b) introducerea perlitului expandat în bioreactor la atingerea temperaturii de 45°C; c) realizarea mediului de creștere/stimulare; d) sterilizarea prin autoclavare la 121°C, timp de 15 min la 1,2 atm a mediului; e) inocularea tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis*, reprezentând 1% din compoziție, în mediul de creștere/stimulare; f) incubarea la 28°C, agitare 150rpm, timp de 48h, obținându-se cultura cu densitatea de 15,8x10⁴ celule viabile/ml; g) bioaugmentarea și biostimularea perlitului expandat prin imersia în această cultură, cu un volum de 2,2 ori mai mare decât greutatea perlitului; h) presurizarea la 6,5atm timp de 30min; i) transvazarea perlitului expandat bioaugmentat și biostimulat j) incubarea la 28°C a perlitului expandat bioaugmentat și biostimulat pentru 48h; k) uscarea în flux de aer la 25°C, 30min și ambalarea în pungi sterile de polietilenă de 1Kg; l) conservarea optimă la 4°C timp de 120zile.

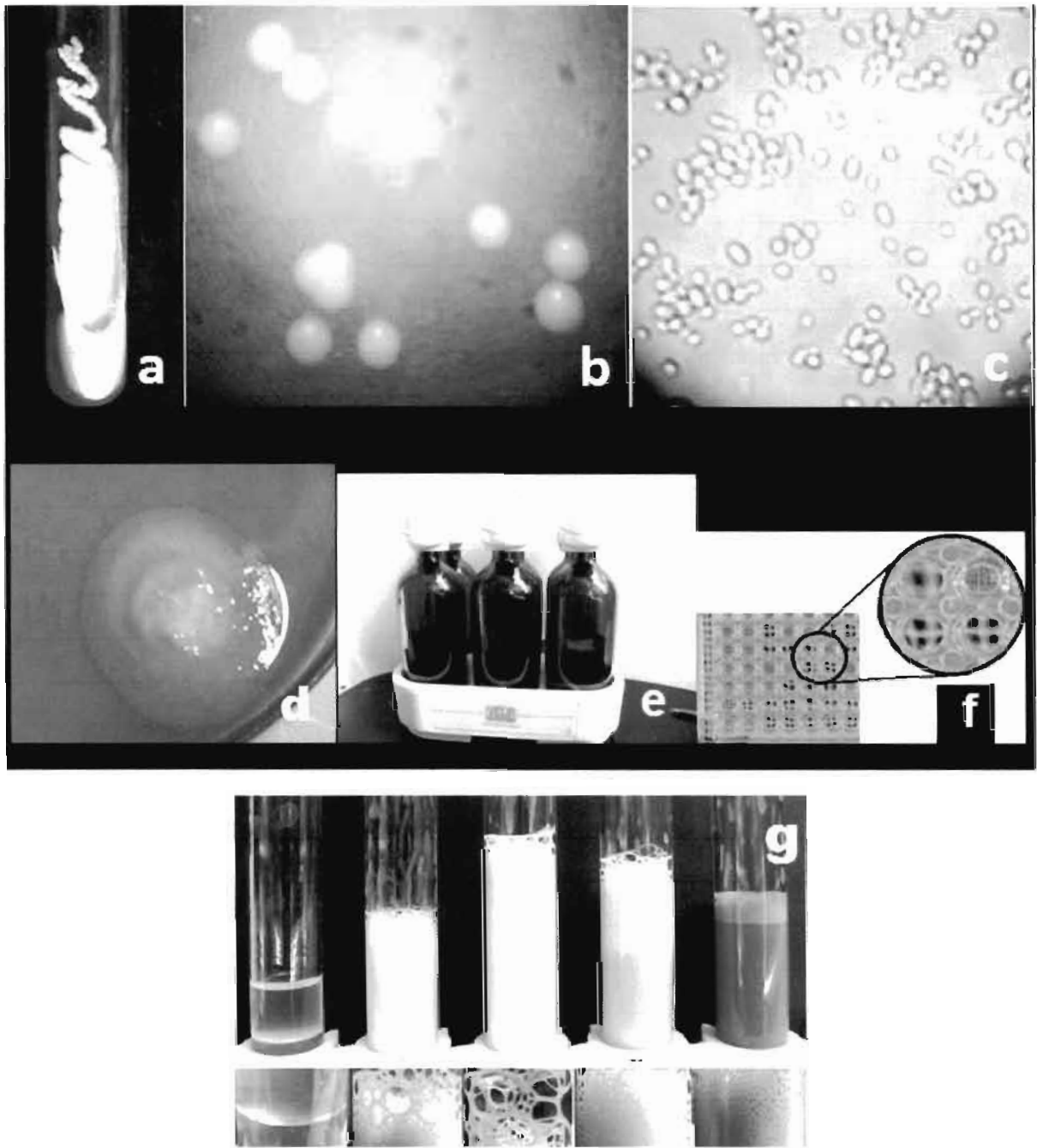


Figura 1.

a), b), c), d), e), f), g)

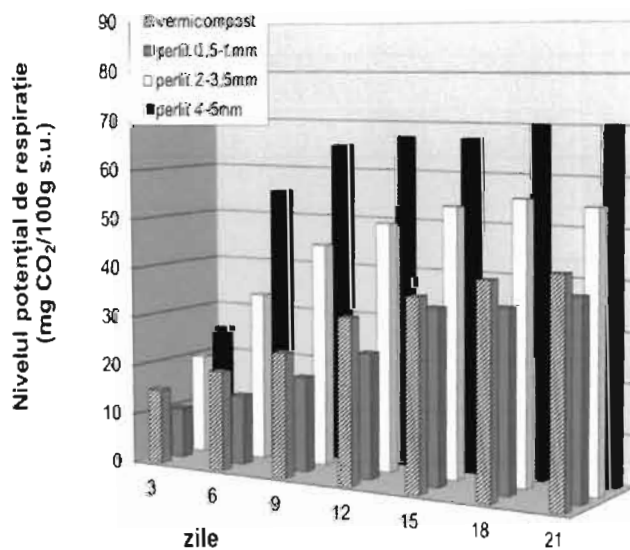
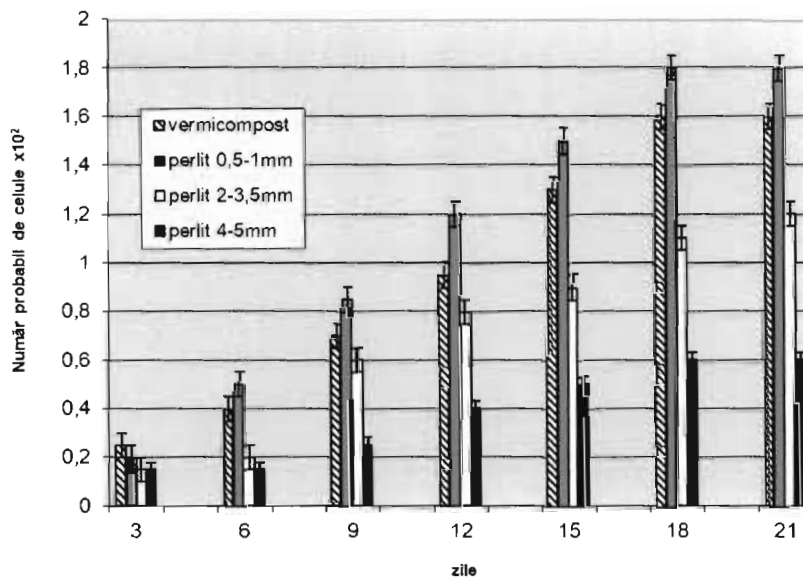
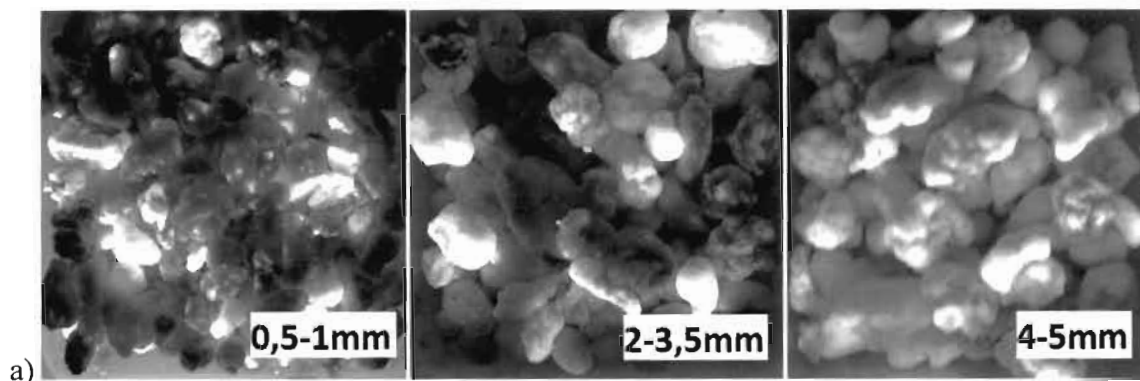


Figura 2
a), b), c)