



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27/11/2020** BOPI nr. **11/2020**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 3870599; KR 20170022367 (A)

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



RO 133486 B1

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

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

18 Introducerea absorbantului în solul contaminat este legată și de prezența micro-
19 organismelor inoculate capabile să degradeze contaminanți specifici, de tipul hidrocarburilor
20 petroliere, a microorganismelor care tratează contaminanții ca potențiale surse de carbon,
21 astfel încât remedierea să devină mai eficientă și mai rapidă. De asemenea, s-a studiat
22 efectul introducerii nutrienților de azot și fosfor care facilitează creșterea microorganismelor
23 (**Wu și colab., 2016. Int Biodeterior Biodegrad. 107: 158-164; Varjani SJ, 2017.
24 Bioresour Technol. 2017; 223: 277-286; Kim și colab., 2018. Sci Total Environ. 612:
25 903-913**), s-a evaluat siguranța mediului la aplicarea de absorbant pentru bioremedierea
26 solului (**Gautam și colab., 2013, J Environ Chem Eng. 2014; 2(1): 239-259**).

27 Utilizarea surfactanților microbieni în tehnologiile de mediu a fost analizată, inclusiv
28 a contribuțiilor biosurfactanților la bioremedierea naturală sau indusă (**Lawniczak și colab.,
29 2013. Applied Microbiology and Biotechnology 97 (6): 2327-2339**); (**Pirog T.P., 2015.
30 Biotechnologia Acta 8 (4): 21-39**), bioremedierea cu ajutorul biosurfactanților a
31 contaminărilor cu hidrocarburi (**Souza și colab., 2014. Int. Biodeterior. Biodegrad., 89: 88-
32 94; Rita Silva și colab., 2014. Intern. J. Molec. Sci. 15 (7): 12523-12542; Bezza și colab.,
33 Process Biochemistry, 2015, 50 (11): 1911-1922; Bezza și colab., Chemosphere, 2016,
34 144: 635-644; Xixi și colab., International Biodeterioration & Biodegradation 2018, 132:
35 216-225**). Au fost realizate caracterizări și comparații ale biosurfactanților cu surfactanții
36 sintetici în privința eficienței în bioremedierea solului contaminat cu hidrocarburi (**Moldes și
37 colab., 2013. BioMed Res. Intern., 1-6**), privind tratamentele *ex situ* ale solului contaminat
38 cu hidrocarburi folosind biosurfactanți provenind de la *Lactobacillus pentosus* (**Moldes și
39 colab., 2011. J. Agric. Food Chem., 59, (17): 9443-9447**). De asemenea, a fost studiat rolul
40 agenților tensioactivi produși de microorganisme în facilitarea motilității celulelor pe suprafețe
41 solide, aderența/detașarea pe suprafețe sau biofilme (**Rojo R, 2009. Environ. Microbiol.,
42 11: 2477-2490**), biodegradabilitatea, siguranța ecologică și toxicitatea (**Liu și colab., Mar.
43 Pollut. Bull, 2016,107:46-51**).

44 Brevete care descriu procesele de transformare microbială folosind celule sau
45 sisteme de celule imobilizate: (**DE 3176978 D1, EP 0303262 A3, DE 3165230 D1,
46 EP 0155669 A3**), suporturi pentru susținerea și utilizarea microorganismelor (**JPS 63173590
47 A, JPS 63229144 A**), suporturi anorganice pentru bioremediere (**US 6107067 A,**

RO 133486 B1

US 5395808 A, US 5403799 A), formarea biofilmului microbial pe suport poros (1
(**US 6881445 B1, DE 19843410650**), metode de imobilizare a celulelor microbiene (3
(**BE 884876 A, DE 3165230 D1, BE 884878 A, EP 0046614 B1**).

Brevetul **US 6908753 B1** realizează un suport pentru cultura bacteriană în care (5
produsul conține oligoelemente și săruri nutritive pentru creșterea bacteriilor incluse într-un (5
material poros, asigurând numai o densitate ridicată a bacteriilor.

Brevetul **US 5096814** descrie un suport poros anorganic util pentru imobilizarea (7
celulelor vii de microorganisme utilizat în purificarea reziduurilor sau în producerea (9
biotehnologică a unor substanțe nutritive esențiale. Suportul poros descris a prezentat un (9
volum de 20...80% pori deschiși, numai macropori cu diametre pînă la 500 μm.

Brevetul **US 5395808** prezintă tot un suport poros anorganic adecvat pentru celulele (11
vii, cum ar fi bacteriile, dar diametrul mediu al porilor este între 0,5...100 μm și volumul total (13
al porilor de numai 0,1...1,0 cm³/g.

În brevetul **DE-OS2839580** se descrie un material suport poros pentru imobilizarea (15
microorganismelor, în care peste 70% din pori sunt similari celei mai mici dimensiuni a (15
microorganismelor.

În **WO 200001803 A1** se descrie o metodă de utilizare a unor materiale suport (17
poroase de oxid, însă fără macropori, ca materiale suport pentru imobilizarea micro- (19
organismelor în bioreactor, a unui compozit și a unui sistem bioreactor-microorganism util (19
în biotratarea contaminanților reziduali. Dezavantajul suportului poros conform invenției îl (21
reprezintă absența substanțială a macroporilor, respectiv a porilor peste 800 Å. (21

În **EP 0186125 A2** locul suportului convențional pentru atașarea microorganismelor (23
utilizate în diferite reacții microbiologice este luat de filamente realizate însă dintr-o rășină (23
sintetică cu capacitate mare pentru susținerea celulelor microbiene, eficientă în reacțiile (25
microbiologice, dar care poate fi îmbunătățită prin încălzire, prin acoperirea suprafeței (25
suportului cu o plasă sau cu o peliculă perforată.

US 4791061 A se referă la o metodă de imobilizare a microorganismelor în granule (27
de poliuretan, polietilen glicol sau poliacrilamidă. Se prezintă formarea de particule care (29
conțin microorganisme protejate de substanțe toxice, precum inițiatorul de polimerizare. (29
Dezavantajele sunt legate de imobilizarea redusă, durabilitatea și toxicitatea inițiatorului de (31
polimerizare asupra microorganismelor. (31

În **US 5395808 A** sunt prezentate produse poroase adecvate utilizării ca suporturi (33
pentru catalizatori, inclusiv celule vii. Suporturile poroase au un diametru mediu semnificativ (33
al porilor de 0,5...100 μ (de la 5 000 pînă la 1000000 Å) și un volum total de pori (35
0,1...1,5 cm³/g, porii mari contribuind la volumul total al porilor cu 0,1...1,0 cm³/g. Suporturile (35
sunt realizate prin prepararea unui amestec din particule de argilă legată cu unul sau mai (37
mulți lianți anorganici. (37

Procedeele care face obiectul din **US 3821086 A** permite formarea de chelați între (39
celulele microbiene și hidroxizii metalici pentru imobilizarea substanțelor biologic active (39
având suport anorganic, iar **US 4115198** vizează imobilizarea celulelor întregi și a substanțelor (41
biologic active utilizând acoperirea suportului cu precipitatul unui oxid metalic hidratat și (41
formarea chelaților responsabili de adsorbția acestora. Dezavantajele sunt legate de (43
menținerea contactului direct al populației microbiene imobilizate cu mediul lichid cât și (43
controlul privind caracteristicile precipitatelor. (43

Deși există studii asupra materialelor suport, privind dezvoltarea unor materiale (45
suport utile, problemele imobilizării microorganismelor nu au fost încă rezolvate, iar aspecte (45
precum densitatea, rezistența, stabilitatea, comportamentul pe termen lung, umectabilitatea (47
și altele asemenea, necesită o continuare a studiilor în domeniu. (47

RO 133486 B1

1 Invenția se referă la domeniul biotehnologiei, reprezintă un procedeu de bioaugmen-
tate și biostimulare a unui absorbant anorganic natural de tipul perlitului expandat cu celule
3 de *Candida parapsilosis* tulpina YCP124 pentru utilizare în bioremedierea solurilor
contaminate cu petrol.

5 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
7 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
9 biodegradabile în orizontul superior 0...20 cm al solurilor agricole scade rezervele de oxigen
din sol și reduce viteza de difuzie a oxigenului în straturile mai adânci. Reziduurile petroliere,
11 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
13 limitativi pentru toate tipurile de degradare ale petrolului.

15 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
depusă sub forma unor filme subțiri pe componentele structurale ale solului.

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

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

23 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
25 proceselor biologice (biodegradare/biosinteză) asigurat de compoziția mediului de creștere
și stimulare introdus prin absorbție în perlitul expandat, împreună cu tulpina YCP124 de
27 *Candida parapsilosis*. Prezența reziduurilor petroliere în sol se reduce prin acțiunea
biodegradativă continuă a bio-absorbantului, rezolvându-se problema reciclării absorbantului
29 aplicat, aspect deosebit de important, deoarece simplifică foarte mult utilizarea lui practică.

31 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
33 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
35 pieței.

37 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
39 poluantul, gradul de hidrofobicitate, rezistența mecanică ridicată, capacitatea de imobilizare
a celulelor în raport cu alte materiale suport, nivelul costurilor de imobilizare, reducerea/elimi-
narea limitărilor de difuzie și a dezactivărilor din timpul imobilizării, capacitatea de încărcare
41 în matricea suport granulară.

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

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

RO 133486 B1

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 silicice 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.

RO 133486 B1

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

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

În general, microorganismele edafice, bacterii/fungi, au fost utilizate pentru îndepăr-
13 tarea 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
15 tratat sau (2) microorganismele pot fi immobilizate (în materiale suport, încapsulate), ca în
cazul invenției, unde există o separare distinctă între microorganisme și solul tratat.

17 În cadrul invenției, a fost preferată immobilizarea pe suport deoarece utilizarea în
practică a inoculărilor cu microorganisme libere care pot fi amestecate direct cu solul
19 determină schimbări în structura comunităților microbiene indigene, influențează competițiile
trofice și interacțiunile antagoniste/sinergice cu populațiile microbiene rezidente, prin
21 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,
23 schimbări în compoziția microbială prin pierderea unor specii native, influențe asupra
nivelului diversității și al interacțiunilor în sistemul biotă-sol-plantă, apar modificări funcționale
25 de ansamblu ale sistemului datorită redundanței și determină adaptare datorată expunerii
prelungite a comunităților microbiene.

27 Aplicarea în practică a celulelor immobilizate este considerată mai eficientă decât cea
cu celulele libere, deoarece conduce la o încărcare mai mare cu biomasă, la operarea mai
29 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
31 crescută a plasmidelor celulare.

Alte materiale suport de tip lignocelulozic, ceramic, polimeri naturali sau sintetici
33 utilizați induc celulelor immobilizate 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
35 și fosforul din mediul adiacent.

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

Celulele tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* prezintă caracteristici care le
39 favorizează în condițiile utilizării lor prin immobilizare în perlitul expandat. Culturile genului
Candida, în general, se adaptează și rezistă ușor proceselor industriale care utilizează
41 una/mai multe transformări biochimice. Tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* este
capabilă de degradare și sinteză, poate fi immobilizată pe un suport anorganic natural, cu o
43 compoziție constantă și bine definită și în care procesele biochimice pot fi
optimizate/intensificate prin aportul mediului de creștere și stimulare. Mediul lichid pentru
45 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
47 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
49 creștere și stimulare.

RO 133486 B1

Celulele tulpinii YCP124 de <i>Candida parapsilosis</i> immobilizate pe suportul anorganic natural (perlit expandat) sunt stabilizate prin adsorbția internă. Stabilitatea și variațiile acestora au fost analizate prin evaluări privind viabilitatea, caracteristicile biochimice și de creștere standard, susceptibilitatea la xenobiotice, inclusiv modul de stocare pe termen lung.	1
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 immobilizare și funcționalitate alese, prin proprietățile membranare în raport cu încărcarea de suprafață a suportului în intervalul funcțional de pH.	3
În timpul producerii, transportului și stocării, inoculantul immobilizat 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.	5
Hydrocarburile 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.	7
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.	9
Prin biostimulare sunt modificate parametri 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.	11
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.	13
În cazul immobilizării celulelor tulpinii YCP124 de <i>Candida parapsilosis</i> 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 immobilizare eficientă prin valorificarea suprafețelor de aderență a pereților micro- și macroporilor interni ai granulelor de perlit expandat. Utilizarea biosurfactanților produși de tulpina YCP124 de <i>Candida parapsilosis</i> immobilizată pentru amplificarea efectului biodegradativ și eficientizarea	15

RO 133486 B1

1 bioremedierii solurilor poluate se încadrează în tiparul abordărilor emergente concentrate pe
utilizarea și pe aplicarea acestora pentru restabilirea sănătății solului și îmbunătățirea
3 producției agricole într-un mod durabil.

Problema pe care o rezolvă invenția de față constă în bioaugmentarea unui material
5 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.

7 Tulpina de *Candida parapsilosis*, YCP124, depozitată la Microbial Strain Collection
of Latvia, University of Latvia, pe 27.08.2018, conform cerințelor tratatului de la Budapesta,
9 cu numărul P1554, este caracterizată prin aceea că pe mediul YPGA prezintă colonii
convexe, netede, de culoare albă-crem, lucioase, cu margini întregi, rotunde, celule ovale
11 până la rotunde, 2,5...5,5 μm, cu înmugurire polară, nu formează hife/pseudohife, urează
negativă, produce EPS, crește pe mediul MRS agar, este izolată din sol contaminat cu
13 hidrocarburi petroliere și prezintă capacitate biodegradativă a hidrocarburilor și de sinteză
a biosurfactanților. Tulpina a fost capabilă să utilizeze kerosen, motorină și țigetei, ca surse de
15 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.

17 Mediul de creștere și stimulare a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* are
următoarea compoziție: glucoză 1 g/L, acetat de sodiu 1 g/L, oxaloacetat 1 g/L, citrat de
19 amoniu 5 g/L, sulfat de amoniu 5 g/L, clorură de amoniu 8 g/L, fosfat monopotasic 5 g/L,
clorură de calciu 0,1 g/L, clorură de sodiu 0,1 g/L, clorură ferică 200 μg/L, sulfat de magneziu
21 500 μg/L, sulfat de zinc 400 μg/L, sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, iar după
sterilizarea mediului se adaugă cisteină 50 mg/L, metionină 50 mg/L, biotină 2 μg/L,
23 riboflavină 200 μg/L sterilizate prin filtrare (45 μm), 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.

25 Procedul de bioaugmentare a perlitului expandat cu tulpina YCP124 de *Candida*
parapsilosis și crescută pe mediul de creștere și stimulare de mai sus, este alcătuit din
27 următoarele etape: a) sterilizarea termică a perlitului cu granulațiile de 4 mm (maximum 5%
< 0,5 mm), cu densitate în grămadă în stare afânată 70 kg/m³, timp de 60 min la 650°C; b)
29 introducerea perlitului expandat în bioreactor la atingerea temperaturii de 45°C; c) realizarea
mediul de creștere/stimulare; d) sterilizarea prin autoclavare la 121°C, timp de 15 min la
31 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 150 rpm, timp
33 de 48 h, obținându-se cultura cu densitatea de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml; g) bioaugmen-
tarea și biostimularea perlitului expandat prin imersia în această cultură, cu un volum de 2,2
35 ori mai mare decât greutatea perlitului; h) presurizarea la 6,5 atm timp de 30 min; i)
transvazarea perlitului expandat bioaugmentat și biostimulat j) incubarea la 28°C a perlitului
37 expandat bioaugmentat și biostimulat pentru 48 h; k) uscarea în flux de aer la 25°C, 30 min
și ambalarea în pungi sterile de polietilenă de 1 kg; l) conservarea optimă la 4°C timp de
39 120 zile.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

41 - tulpina utilizată în cadrul procedurii nu este modificată genetic și prezintă o relativă
stabilitate genetică;

43 - permite o bună imobilizare în perlit expandat a tulpinii YCP124 de *Candida*
parapsilosis, fără utilizarea agenților de reticulare sau hidrofobicizare;

45 - celulele imobilizate prezintă un grad ridicat de viabilitate, capacitate crescută de
reținerere și de reacție enzimatică, de reproducere într-un mediu adecvat;

47 - un volumul de mediu mai mic în cazul procedurii de imobilizare a celulelor decât
în cazul metodelor convenționale;

RO 133486 B1

- utilizează un mediul lichid pentru creșterea și stimularea celulară format dintr-un complex de nutrienți, astfel eliminând necesitatea unor soluții suplimentare; 1
 - nu implică microorganisme suplimentare inoculate pentru a furniza azot și fosfor mineral; 3
 - se reduc costurile de imobilizare în suportul anorganic, nefiind necesare pre-tratamente (soluții) sau post-tratamente (încapsulare); 5
 - este ecologică, acționând eficient, prin caracteristicile ansamblului suport-celule imobilizate, pentru stabilizarea contaminatului, biodegradarea și împiedicarea scurgerilor acestuia; 7
 - se reduc/elimină limitările de difuzie și dezactivările care apar în timpul imobilizării celulelor; 9
 - 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; 11
 - permite biodegradarea hidrocarburilor din sol prin utilizarea unui material absorbant care poate rămâne în sol pe o perioadă nedefinită; 13
 - permite manipulări atât în condiții *in situ* cât și *ex situ* datorate rezistenței mecanice ridicate asigurată ansamblului de tip bio-suport; 15
 - 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; 17
 - creșterea biodiversității în sol prin utilizarea energiei libere generată de prezența în microhabitat a substratului hidrocarbonat și generarea metaboliților secundari valorificabili de alte microorganisme; 19
 - 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; 21
 - 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; 23
 - 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; 25
 - promovează în mod semnificativ procesele de bioremediere, reduce costurile acestora și asigură condiții funcționale biocatalizatorilor. 27
- Prezența invenției se ilustrează prin următoarele exemple, în legătură cu fig. 1 și 2 care reprezintă: 29
- fig. 1a, reprezintă tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* în cultură pură; 31
 - fig. 1b, reprezintă tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* - aspectul coloniilor pe mediul YPGA; 33
 - fig. 1c, reprezintă tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* - aspectul celulelor; 35
 - fig. 1d, colonie tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* pe mediu BH cu 1% petrol; 37
 - fig. 1e, reprezintă evaluarea capacităților biodegradative ale tulpinilor testate (1% kerosen, 28 zile); 39
 - fig. 1f, reprezintă evaluarea calitativă a capacităților de sinteză a biosurfactanților de către tulpinile testate; 41
 - fig. 1g, reprezintă aspectul emulsiilor cu Tween 80 (martor) și a biosurfactanților produși de tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* cu kerosen, motorină și petrol; 43

RO 133486 B1

1 - fig. 2a, evidențierea prin fluorescență a nivelului activității biologice din perlitul
expandat cu granulații de 0,5...1 mm, 2...3,5 mm, 4...5 mm și bioaugmentat cu tulpina
3 YCP124 de *Candida parapsilosis* la o densitate în mediu de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml;
- fig. 2b, numărul cel mai probabil de celule libere din spațiul intergranular;
5 - fig. 2c, nivelul potențial de respirație al celulelor tulpinii YCP124 de *Candida*
parapsilosis immobilizate în perlitul expandat cu granulații de 0,5...1 mm, 2...3,5 mm și
7 4...5 mm.

Exemplul 1

9 *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
11 *biodegradative cât și de sinteză a biosurfactanților*

Au fost izolate și selectate microorganisme edafice aparținând genului *Candida* care
13 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
15 poluare foarte slab (0,1...0,2%), mediu (0,5...1%) și puternic (1...1,5%) și care aparțin la
3 tipuri de sol.

17 Principalele caracteristicile fizico-chimice ale solurilor pe adâncimea 0...20 cm sunt
pentru Aluviosol, o încărcare foarte slabă de reziduu petrolier total (0,165%), pH-7,2, un
19 conținut de humus de 1,37%, fosfor 7,3 ppm, 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
21 4,0 ppm, 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 2,9 ppm, săruri 0,070%.

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

Toate cele 17 tulpini nemodificate genetic au fost testate pentru capacitatea de
27 utilizare a hidrocarburilor și de sinteză a biosurfactanților. Capacitatea de utilizare a
hidrocarburilor de către tulpinile selectate a fost evaluată calitativ pe baza activității
29 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
31 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
33 optică pe microplăci (fig. 1f).

Pe baza rezultatelor obținute în urma analizelor calitative și cantitative a fost selectată
35 tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* care a prezentat cea mai ridicată capacitate
biodegradativă (87,36%) cât și de sinteză a biosurfactanților (10,4 g/L) Tulpina YCP124 de
37 *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 4,0 ppm, săruri 0,024%,
39 încadrarea taxonomică a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* este *Filum Ascomycota*,
Subfilum Saccharomycotina, Clasa *Saccharomycetes*, Ordinul *Saccharomycetales*, Familia
41 *Saccharomycetaceae*, Genul *Candida*, Specia *Candida parapsilosis* Langeron &
Talice(1932), Sinonim cu *Mycocandida parapsilosis* C. W. Dodge (1935), *Mycotorula*
43 *parapsilopsis* Cif. & Redaelli (1943), *Candida quercus* Montrocher & Claisse (1984).

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

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

RO 133486 B1

La microscopul optic prezintă celule ovale până la rotunde, 2,5...5,5 μm, cu înmugurire polară și nu formează hife/pseudohife (fig. 1c).	1
Tulpina YCP124 de <i>Candida parapsilosis</i> nu produce urează, produce exopolizaharide (EPS), poate crește pe mediul MRS agar.	3
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-Trehaloză (+), Celobioză (+), Rafinoză (+/-), Glycerol (s/-), 2-Keto-D-glucoză (+/-), Citrat (+) și a azotului, pentru L-Lizină (+).	5
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.	7
Tulpina a fost capabilă să producă biosurfactanți și să crească pe sursele de carbon studiate, respectiv kerosen, motorină și țigței (fig. 1d). La utilizarea kerosenului tulpina a avut cea mai eficientă activitate degradativă (87,36%) (fig. 1e) și a produs cele mai mari cantități de biosurfactant (10,4 g/L). În cazul utilizării motorinei și țigțeiului de către tulpina YCP124 de <i>Candida parapsilosis</i> activitatea degradativă a fost de 74,82% și respectiv 61,54% și a produs 7,2 g/L și respectiv 5,82 g/L biosurfactant. Biosurfactanții sintetizați au fost capabili să emulsioneze hidrocarburile testate (fig. 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 48 h de incubare.	9
Condiții de cultivare: pe mediile YPGA (extract de drojdie 5 g/L, peptonă 10 g/L, glucoza 20g/L, agar-agar 20 g/L), Merk și pe MRS (De Man Rogosa-Sharpe) lichid, Liofilchem (IS015214) 54,3 g/L, pH 6,2, autoclavate 15 min la 121°C.	11
Condiții de depozitare: Culturi pure în eprubete cu mediile YPGA și MRSA solide înclinate, la 2...5°C (fig. 1a).	13
Condiții de testare a viabilității: Incubare pe mediul de cultură YPG lichid, 48 h la 28°C.	15
Exemplul 2	17
S-a evaluat influența mărimii granulelor de perlit expandat, a concentrației inoculului asupra imobilizării celulare.	19
Perlitul expandat utilizat ca suport natural anorganic pentru imobilizarea celulelor are culoare albă, este dur și foarte poros, cu densitate 0,9 g/cm ³ , umiditate 0,3%, pH 7,2, indice de refracție 1,5, conductivitatea termică la 24°C 0,04...0,06 W/m8·K, 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%.	21
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...1 mm, saturația în apă a fost foarte rapidă, independent de umiditatea inițială. Pentru granule de 2...3,5 mm 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...5 mm cu o saturație în apă foarte lentă (60 min).	23

RO 133486 B1

1 Concentrația optimă a mediului de creștere/stimulare în celule aparținând tulpinii
2 YCP124 de *Candida parapsilosis* a fost determinată prin imersia granulelor de perlit cu
3 dimensiuni diferite (0,5...1 mm, 2...3,5 mm, 4...5 mm) și de vermicompost în mediul cu
4 densități diferite de celule viabile/ml ($8,9 \times 10^3$; $87,5 \times 10^3$; $15,8 \times 10^4$). Perlitul expandat
5 utilizat ca suport anorganic natural cuprinde grupări oxid/hidroxid, disponibile, care permit
6 o bună adsorbție. După transvazarea perlitului din mediul de imersie, incubare la 28°C pentru
7 48 h, s-a determinat calitativ nivelul activității biologice a celulelor imobilizate prin intensitatea
8 exometabolismului secundar (evidențiată prin utilizarea acridinei ca fluorocrom) (fig. 2a) și
9 cantitativ s-a determinat numărul cel mai probabil de celule libere, detașabile în spațiul
10 intergranular (fig. 2b) și nivelul potențial de respirație pentru activitatea globală (fig. 2c).
11 Datele prezentate sunt valori medii ale determinărilor având trei repetiții, au fost analizate
12 statistic pentru $P < 0,05$.

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

Exemplul 3

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

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

26 Pentru bioaugmentare și biostimulare 4,5 kg perlit expandat de 4...5 mm a fost
27 introdus în mediul lichid din bioreactor, într-o cantitate de lichid de 2,2 ori mai mare decât
28 greutatea perlitului, concentrația inoculului (1%, v/v).

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

31 Varianta A: glucoza 0,1 g/L, acetat de sodiu 0,1 g/L, oxaloacetat 0,1 g/L, citrat de
32 amoniu 0,5 g/L, sulfat de amoniu 0,5 g/L, clorură de amoniu 0,8 g/L, fosfat monopotasice
33 0,5 g/L, clorură de calciu 0,01 g/L, clorură de sodiu 0,01 g/L, clorură ferică 20 μg/L, sulfat de
34 magneziu 50 μg/L, sulfat de zinc 40 μg/L. Mediul a fost sterilizat prin autoclavare la 121°C
35 timp de 20 min. După sterilizarea mediului se adaugă cisteină 5 mg/L, metionină 5 mg/L, bio-
36 tină 2 μg/L, riboflavină 20 μg/L sterilizate prin filtrare (45 μm), pH-ul final al mediului de 6,5.

37 Varianta B: glucoza 1 g/L, acetat de sodiu 1 g/L, oxaloacetat 1 g/L, citrat de amoniu
38 5 g/L, sulfat de amoniu 5 g/L, clorură de amoniu 8 g/L, fosfat monopotasice 5 g/L, clorură de
39 calciu 0,1 g/L, clorură de sodiu 0,1 g/L, clorură ferică 200 μg/L, sulfat de magneziu 500 μg/L,
40 sulfat de zinc 400 μg/L. Mediul a fost sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20 min.
41 După sterilizarea mediului se adaugă cisteină 50 mg/L, metionină 50 mg/L, biotină 2 μg/L,
42 riboflavină 200 μg/L sterilizate prin filtrare (45 μm), pH-ul final al mediului de 5,5.

43 Varianta C: glucoza 10 g/L, acetat de sodiu 10 g/L, oxaloacetat 10 g/L, citrat de
44 amoniu 15 g/L, sulfat de amoniu 15 g/L, clorură de amoniu 18 g/L, fosfat monopotasice 15 g/L,
45 clorură de calciu 1 g/L, clorură de sodiu 1 g/L, clorură ferică 2 mg/L, sulfat de magneziu
46 5 mg/L, sulfat de zinc 4 mg/L. Mediul a fost sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de
47 20 min. După sterilizarea mediului se adaugă cisteină 500 mg/L, metionină 500 mg/L, biotină
48 20 μg/L, riboflavină 2 mg/L sterilizate prin filtrare (45 μm), pH-ul final al mediului de 5.

RO 133486 B1

După incubare la 28°C pentru 48 h, 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 (tabelul 1).

Influența compoziției mediului asupra parametrilor biologici

Tabelul 1

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 imobilizate. 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 (24 h, 48 h, 72h). După incubare, toate au fost uscate la 25°C, 30 min.

S-a testat vitalitatea (tabelul 2) prin colorare fluorescentă cu acridin oranj (% celule colorate) și viabilitatea în timp a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* cu MTT la 570 nm, pentru o perioadă de 120 de zile, menținând la 4°C granulele ambalate în pungi sterile de polietilenă de 1 kg. Temperatura optimă pentru incubare a fost de 28°C, timp de 48h (tabelul 2).

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

Tabelul 2

Temperatura	Timp			
	24 h	48 h	72 h	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 imobilizată eficient în perlit expandat cu granulație de 4 mm 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

RO 133486 B1

1 biosurfactanților, prezintă un grad ridicat de viabilitate al celulelor imobilizate, mediul lichid
2 pentru bioaugmentare și stimulare celulară elimină necesitatea unor soluții suplimentare sau
3 microorganismele în furnizarea de azot și fosfor mineral, procedeul nu implică liofilizări, evită
4 mutații/contaminări, permite biodegradarea hidrocarburilor din sol prin utilizarea materialului
5 absorbant, care poate rămâne în sol pe o perioadă nedefinită, permite manipularea *in situ*
6 și *ex situ*, oferă un mecanism de mobilizare a contaminanților din sol și de creștere a
7 accesibilității lor pentru populațiile microbiene; funcționează în condiții de mediu microaerob
8 indus de factorii de mediu; reduce/elimină limitările de difuzie și dezactivările din timpul
9 imobilizării celulelor, crește biodiversitatea în sol utilizând energia liberă generată de
10 prezența în microhabitat a substratului hidrocarbonat și generează metaboliți secundari
11 valorificabili de alte microorganismele, biosurfactanții sintetizați valorifică eficient resursele
12 energetice adiacente, nu afectează solul datorită biodegradabilității mari, toxicității scăzute,
13 prezintă siguranță ecologică; stabilizează contaminații, intensifică biodegradarea și împiedică
14 scurgerile, asigură condiții funcționale biocatalizatorilor, promovează procesele de bioreme-
15 diere și reduce costurile acestora. Tulpina YCP124 de *Candida parapsilosis* imobilizată în
16 perlit expandat poate fi utilizată și în producerea la scară largă a biosurfactanților, cu costuri
17 mai mici de producție, pentru diverse utilizări.

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

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

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

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

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

RO 133486 B1

Revendicări

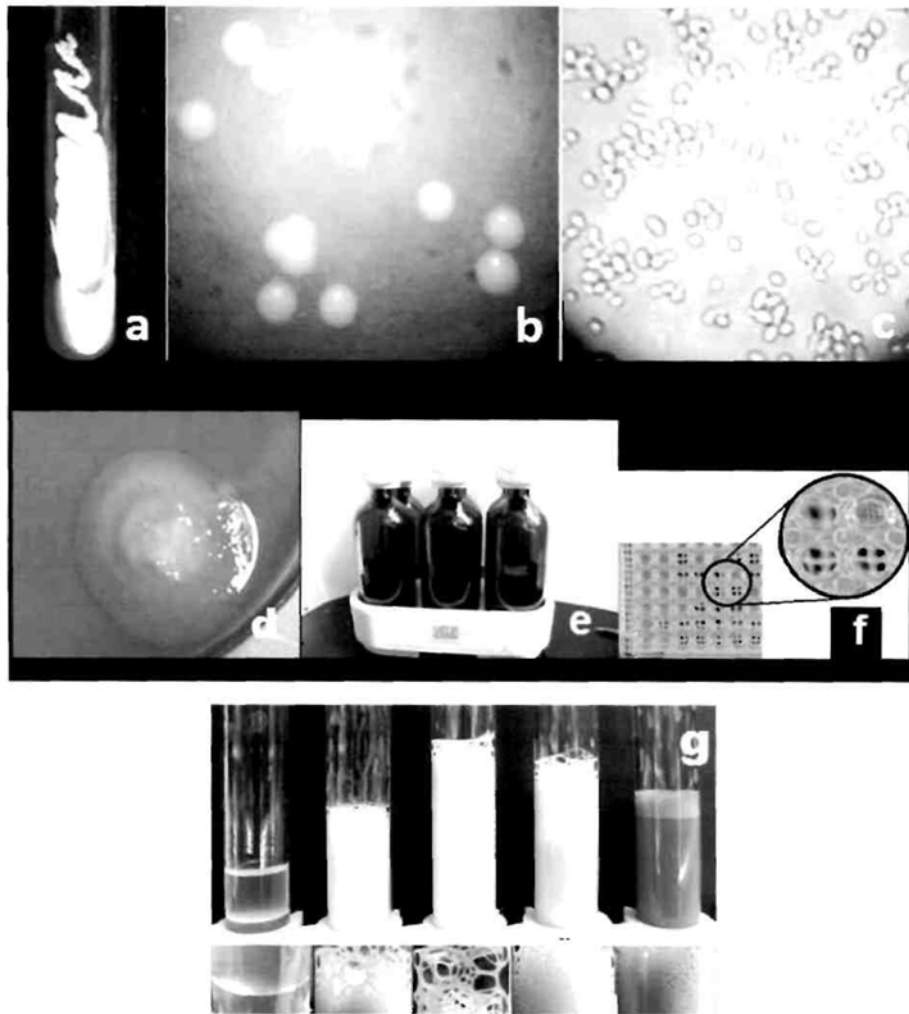
1. Tulpină de *Candida parapsilosis*, YCP124, depozitată la Microbial Strain Collection of Latvia, University of Latvia, pe 27.08.2018, conform cerințelor tratatului de la Budapesta, cu numărul P1554, **caracterizată prin aceea că**, pe mediul YPGA prezintă colonii convexe, netede, de culoare albă-crem, lucioase, cu margini întregi, rotunde, celule ovale până la rotunde, 2,5...5,5 μm , 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. 3 5 7 9
2. Mediu de creștere și stimulare a tulpinii YCP124 de *Candida parapsilosis* definită în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, are următoarea compoziție: glucoză 1 g/L, acetat de sodiu 1 g/L, oxaloacetat 1 g/L, citrat de amoniu, sulfat de amoniu 5 g/L, clorură de amoniu 8 g/L, fosfat monopotasic 5 g/L, clorură de calciu 0,1 g/L, clorură de sodiu 0,1 g/L, clorură ferică 200 $\mu\text{L/L}$, sulfat de magneziu 500 $\mu\text{g/L}$, sulfat de zinc 400 $\mu\text{g/L}$, sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, iar după sterilizarea mediului se adaugă cisteină 50 mg/L, metionină 50 mg/L, biotină 2 $\mu\text{g/L}$, riboflavină 200 $\mu\text{g/L}$ sterilizate prin filtrare (45 μm), pH-ul final al mediului de 5,5; inoculul (1%, v/v) adăugat la mediul răcit a avut o concentrație de $15,8 \times 10^4$ celule viabile/ml. 11 13 15 17 19
3. 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 4 mm (maximum 5% < 0,5 mm), cu densitate în grămadă în stare afânată 70 kg/m^3 , timp de 60 min 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 150 rpm, timp de 48 h, 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 6,5 atm timp de 30 min; i) transvazarea perlitului expandat bioaugmentat și biostimulat; j) incubarea la 28°C a perlitului expandat bioaugmentat și biostimulat pentru 48 h; k) uscarea în flux de aer la 25°C, 30 min și ambalarea în pungi sterile de polietilenă de 1 Kg; l) conservarea optimă la 4°C timp de 120 zile. 21 23 25 27 29 31 33

(51) Int.Cl.

C12N 11/14 (2006.01);

C12N 1/14 (2006.01);

C12R 1/72 (2006.01)



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

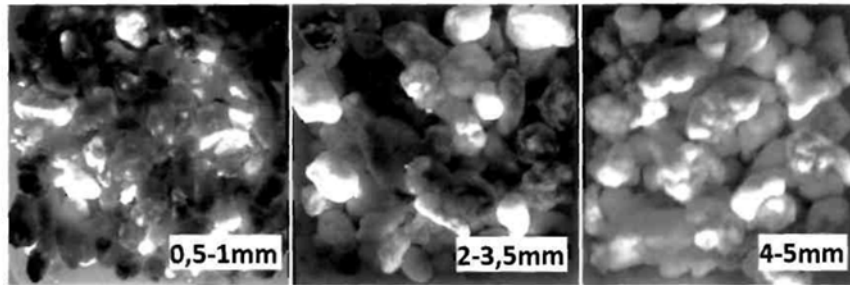
Fig. 1

(51) Int.Cl.

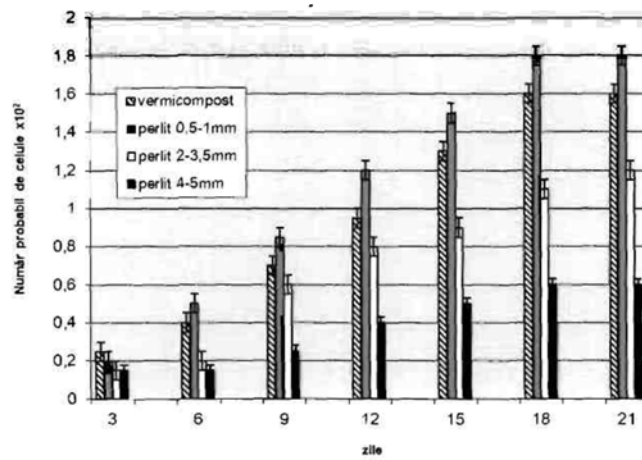
C12N 11/14 (2006.01);

C12N 1/14 (2006.01);

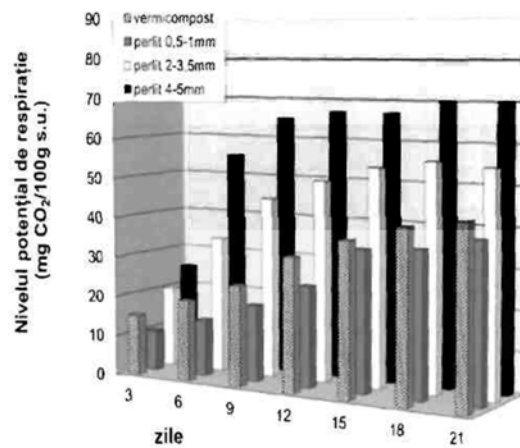
C12R 1/72 (2006.01)



a)



b)



c)

Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 489/2020