



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00424**

(22) Data de depozit: **22/07/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/01/2023** BOPI nr. **1/2023**

(71) Solicitant:  
• **EM ENVIRONMENTAL SOLUTIONS  
S.R.L., STR.DIȚEȘTI, NR.927,  
SAT DIȚEȘTI, COMUNA FILIPEȘTII DE  
PĂDURE, PH, RO**

(72) Inventatori:  
• **MĂRGĂRIT ELENA, DRUMUL TABEREI,  
NR.14, BL.B3, SC.A, AP.14, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CONSTANTINESCU- ARUXANDEI DIANA,  
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,  
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **LUPU CARMEN, INTRAREA BÂRSEI,  
NR.5, ET.2, AP.25, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **COMPOZIȚIE PENTRU SUPTORI ARTIFICIALE MOBILE  
ȘI PROCEDU DE OBTINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție destinată obținerii unor suporturi artificiale mobile care sunt folosite în stațiile de epurare a apelor ca suport pentru formarea biofilmelor active și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția conform invenției este constituită din 5,5...7,0 grame diatomită, 93...94,5 grame polilactidă și cel puțin  $10^9$  ufc bacterii endo - sporulante gram - pozitive. Procedeu de obținere conform invenției constă în cultivarea axenică a bacteriilor endo - sporulante gram - pozitive, cu capacitate de degradare a compu-

șilor organici, pe medii minimale lichide, aerate și agitate, în care este inclusă diatomita, recoltarea diatomitei și a biomasei de microorganisme prin centrifugare, uscarea în pat fluidizat a diatomitei și a biomasei de microorganisme, urmată de încorporarea diatomitei și a biomasei de microorganisme în poliactidă prin amestecare pe valț.

Revendicări: 1



## COMPOZIȚIE PENTRU SUPORTURI ARTIFICIALE MOBILE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la o compoziție destinată obținerii unor suporturi artificiale mobile care sunt folosite în stațiile de epurare a apelor, ca suport pentru formarea biofilmelor bioactive.

Sunt cunoscute diferite tipuri de compoziții pentru realizarea suporturilor artificiale mobile destinată formării biofilmelor (MBBR - *moving bed biofilm reactors*). Această tehnologie, introdusă la începutul anilor '80 ai secolului trecut în Norvegia, utilizează de obicei materiale plastice cu o densitate apropiată de cea a apei (Sonkar *et al.* 2021. *Moving bed biofilm reactors*. in Membrane-Based Hybrid Processes for Wastewater Treatment, Shah și Susana Rodriguez-Couto eds., Elsevier, pp-12-p23). Brevetul RO 123174 B1 se referă la un suport artificial mobil, destinat formării biofilmului microbial cu rol în epurarea apelor, care este alcătuit din polietilenă cu densitatea de 0,97-0,98 kg/dm<sup>3</sup>. Brevetul KR100472005B1 descrie o compoziție pe bază de spumă poliuretanică, la care, pentru a se crește densitatea se adaugă cărbune activat, rășini schimbătoare de ioni și argile naturale. Alte materiale folosite pentru realizarea de suporturi artificiale mobile sunt polipropilena, policlorura de vinil și alcoolul polivinilic (Al-Amshawee *et al.* 2020. Biocarriers for biofilm immobilization in wastewater treatments: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 1925–1945).

Un dezavantaj major al compozițiilor pe bază de polimeri derivați din petrol este cel al reciclabilității reduse a suporturilor artificiale, datorită biodegradabilității lor reduse. De asemenea, biodegradabilitatea redusă a polimerilor derivați din petrol poate contribui la poluarea cu microplastic, având în vedere abraziunea la care sunt supuse suporturile artificiale mobile în timpul operării, datorită ciocnirilor reciproce. Pentru a se elimina aceste dezavantaje au fost propuse suporturi artificiale mobile pe bază de biopolimeri biodegradabili. Un avantaj suplimentar al suporturilor mobile pe bază de polimeri biodegradabili este aderența superioară a biofilmelor la suprafața acestor purtători - Singh *et al.* 2016, *Water Science and Technology*, 73(1), 113-123. Un dezavantaj al bioplasticelor / plasticelor biodegradabile pentru fabricarea de suporturi artificiale mobile este determinat de densitatea lor, care este mai mare decât cea a apei .

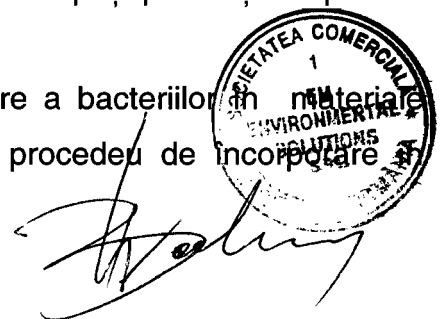
Cererea de brevet WO2013149662 A1 prezintă o compoziție pe bază de bioplastice care sunt selectate din grupul constând dintr-o polilactidă (denumită impropriu și acid polilactic, PLA), un bioplastic pe bază de amidon, un polihidroxiacanoat (PHA), un poli (3-hidroxi-butirat-co-3) - hidroxivalerat (PHBV) și combinații ale acestora. Pentru a se exploata capacitatea superioară a suporturilor artificiale din bioplastic în ceea ce privește aderența biofilmelor, cererea de brevet WO2013149662 A1 include și o soluție de inoculare a acestora. Suporturile artificiale mobile sunt fabricate din lactidă (PLA) și au o formă cilindrică. În interiorul cilindrului sunt introduse tuburi cilindrice, fabricate din bioplastic pe bază de amidon. Introducerea tuburilor cilindrice de amidon se face astfel încât există un spațiu liber. Suporturile artificiale sunt sterilizate prin autoclavare, iar în spațiu liber delimitat de tuburile cilindrice fabricate din amidon se introduce axenic biomasă liofilizată de microorganisme inoculante. Microorganismele sunt selectate dintre următoarele: *Aeromonas* spp., *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Aminobacter* spp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Brevumdimonas* spp., *Cytophaga-Flavobacteria* spp., *Escherichia* spp., *Flavobacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Nocardioides* spp., *Pseudomonas* spp., *gamma-Proteobacteria* spp., *Rhodococcus* spp., *Sphingomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Nitrosomonas europaea*, *Phanerochaete chrysosporium* sau combinații ale acestora.

Pentru a contracara dezavantajul densității crescute, cererea de brevet WO2013149662 A1 prevede existența unor spații goale între cele două componente din bioplastic, PLA și amidon.

Procedeele de fabricarea descrise de cererea de brevet WO2013149662 A1 este complex, necesită prelucrări de mare precizie, ca de ex. introducerea tuburilor din bioplastic pe bază de amidon în cilindrii din PLA, sterilizare prin autoclavare termică și inoculări aseptice cu microorganisme liofilizate. Pentru epurarea apelor sunt necesare suporturi artificiale mobile fabricate prin procedee mai simple.

O soluție tehnică simplă pentru fabricarea de suporturi mobile care includ și microorganisme inoculante ar fi cea de încorporare în bioplastic a bacteriilor destinate inoculării, bacterii care au capacitate semnificativă de bioaugmentare, respectiv capacitate de stimulare a degradării diferiților compuși prezenți în apele în curs de epurare.

Sunt cunoscute diferite procedee de încorporare a bacteriilor în materiale termoplastice. Brevetul US 11028454 B2 descrie un procedeu de încorporare



materiale plastice a microorganismelor rezistente la temperatură și la presiune. Sunt utilizate microorganisme care formează endo-spori, ca de ex. tulpina de *Bacillus amyloliquefaciens* depozitată sub numărul No. ID9698 la Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM), ai cărei spori sunt viabili la temperaturi cuprinse între 100°C and 220°C și/sau la presiuni cuprinse între of 1,5 și 50 bari. Materialele plastice sunt pe baza unor polimeri polari, care au o polaritate, exprimată prin parametrul de solubilitate Hildebrand, de cel puțin 20 (MPa)<sup>1/2</sup>. Polimerii polari au cel puțin un monomer din grupul constituit din: acriilați, metacriilați, acrilamide, metacrilamide, alcooli, amine, anhidride, epoxizi, stireni, vinili funcționaliizați, alii funcționaliizați, propene, butadiene, etilene, isocianați, lactame, lactone, zaharide, glucoză sau esteri. Materialul rezultat prin diferite procedee de prelucrare termoplastică este destinat utilizării ca barieră pentru gaze.

Cererea de brevet EP2718087 A2 prezintă un procedeu de fabricare a unor materiale plastice multistrat, în care sunt incluse diferite tipuri de microorganisme, procariote sau eucariote. Materialul multistrat conține cel puțin un prim strat de bază dublu, compus din material primar (A), ca matrice de înglobare, un strat intermediar secundar (B), inclus în materialul de bază, care reprezintă materialul suport în care este încorporat materialul terțiar (C). Materialul (A) poate fi un polimer, materialul (B) poate fi și un biopolimer, iar materialul C este un lichid, cu viscozitate ridicată, uleios, apos sau pe bază de acriilați. Cererea de brevet este exemplificată pentru realizarea de ambalaje de polietilen-tereftalat, în care microorganismele, *Bacillus subtilis*, dar și lactobacili, ciuperci microscopice, în special conidii, microalge, drojdii sau arhee extremofile, sunt incluse în polietilen tereftalat glicol. Materialul rezultat are funcționalitate de barieră pentru oxigen, CO<sub>2</sub> sau pentru UV, sau de material purtător de celule vii.

Brevetul RO132559 B1 se referă la un procedeu de obținere a unui produs biocompozit stratificat termo- și fonoizolator. Procedeu conform invenției constă în încorporarea biomasei de microorganisme endo-sporulante gram-pozitive, cu o umiditate reziduală de maximum 1%, în pondere de 6% din produsul final, între un film de polipropilenă compoundată cu 5% caolin, în pondere de 47% din produsul final, și un film de polipropilenă compoundată cu 50% paie de grâu, în pondere de 47% din produsul final, prin presare la temperatura de 190°C și presiunea de 200 bari, timp de 5 min, cu răcire bruscă la aceeași presiune, produsul rezultat având biocompatibilitate ridicată.

Procedeele descrise mai sus nu au fost însă concepute pentru a fi utilizate pentru fabricarea de suporturi mobile destinate epurării apelor. Dezavantajul inoculării cu bacterii cultivate, prezervate prin uscare și resuscitate în stare planctonică (mobilă) este dată de necesitatea adaptării de la starea planctonică (mobilă) la starea sesilă (din biofilm). Această tranziție este complicată de existența competiției altor microorganisme competitive, ca și a protozoarelor prădătoare în mediile lichide din stațiile de epurare a apelor. De asemenea procedeele descrise mai sus nu oferă soluții de modificare a densității / flotabilității suporturilor artificiale mobile.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie o compoziție pe bază de bioplastice destinată obținerii unor suporturi artificiale mobile, care să prezinte o densitate cuprinsă între 0,95 și 0,98 kg/dm<sup>3</sup> și care să includă bacterii dezvoltate, prezervate prin uscare și resuscitate direct în stare sesilă, ca și un procedeu de obținere a acesteia.

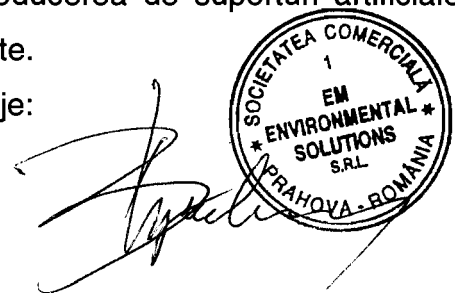
Compoziția, conform invenției, este alcătuită din 5,5 – 7,0 grame diatomită, cu dimensiuni cuprinse între 30 și 40 μm, minim 85% conținut de bioxid de siliciu și max. 1% bioxid de siliciu cristalin, 93 – 94,5 grame polilactidă și cel puțin 10<sup>9</sup> ufc bacterii endo-sporulate gram-pozitive.

Procedeu conform invenției constă în următoarele etape:

- Cultivarea axenică a bacteriilor endo-sporulante gram-pozitive, cu capacitate de degradare a compușilor organici, pe medii minimale lichide, aerate și agitate, în care sunt incluse 5,5 -7,5 grame diatomită cu dimensiuni cuprinse, la pH optim și la aerări de până la 50% saturație de oxigen, și temperaturii de incubare de 30°C;
- Recoltarea diatomitei și a biomasei de microorganisme prin centrifugare la 10.000xg timp de 20 min;
- Uscarea în pat fluidizat a diatomitei și a biomasei de microorganisme, la temperaturi de 75-80°C, până la max. 1% umiditate reziduală;
- Incorporarea diatomitei și a biomasei de microorganisme în poliactidă, 5,5 – 7,5 grame amestec de diatomită – sporii de bacterii gram pozitive cu 93 – 94,5 grame polilactidă, prin amestecare pe valț, la temperatura de 180°C timp de 5 min.

Compoziția rezultată este utilizată pentru producerea de suporturi artificiale mobile, prin extrudare, conform procedeelelor cunoscute.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

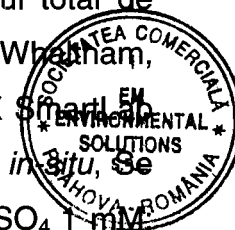


- Asigură eliberarea constantă a unor concentrații mici, biologic active, de acid ortosilicic din diatomită, datorită cultivării microorganismelor pe mediu minimal, care stimulează producerea de către microorganisme a biocompușilor implicați în solubilizarea acidului ortosilicic, iar acidul orto-silicic protejează sporii de bacterii de condițiile extreme, uscarea avansată și amestecare pe valț;
- Prin etapa de uscare în pat fluidizat reduce suplimentar umiditatea reziduală din biomasa de bacterii, favorizând supraviețuirea microorganismelor în condițiile extreme de temperatură;
- Favorizează dezvoltarea bacteriilor în stare sesilă, ca biofilm la suprafața granulelor de diatomită și resuscitarea lor direct în stare sesilă
- Reduce densitatea compoziției datorită densității reduse a diatomitei.

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

*Exemplu 1.* Într-un bioreactor (Biostat® B, Goettingen, Germania), prevăzut cu senzor de pH și senzor de oxigen dizolvat (DO) (InPro6800; Mettler-Toledo AG, Greifensee, Elveția), prevăzut cu un vas de 5 litri, se aduc 2 litri mediu minimal M9 care conține la 1 litru:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidru) 6 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g; NaCl 0.5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g, 10 g lactoză. Se suspendă în mediul rezultat 6 grame de diatomită, cu dimensiuni cuprinse între 30 și 40  $\mu\text{m}$ , minim 85% conținut de bioxid de siliciu și max. 1% bioxid de siliciu cristalin.

Diatomita utilizată se prelucrează după cum urmează. În recipientul de măcinat de 250 ml din oțel inox, al unei mori cu bile (de exemplu P100 Retsch, Verder Scientific, Haan, Germania) se aduc 84 grame de diatomită (Adamclisi, Constanța), 15 bile de inox de 20 mm și 75 ml apă, în recipientul de 250 al unei mori cu bile (de exemplu P100 Retsch, Verder Scientific). Se amestecă intermitent timp de 10 min - 1 min măcinare, 1 min pauză, timp efectiv de măcinare 5 min. Dimensiunile particulelor se determină cu ajutorul unui echipament de măsurare a dimensiunii particulelor Camsizer® X2 (MicroTrac MRB, Verder Scientific). Conținutul total de siliciu se determină cu un echipament ICP-OES Avio 560 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, SUA), iar cristalinitatea s-a determinat cu un difractometru de raze X SmartLab (Rigaku, Tokyo, Japonia). Mediul rezultat se sterilizează prin autoclavare *in situ*, se adaugă apoi nouă microelemente, în următoarele concentrații finale:  $\text{MgSO}_4$  1 mM;  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $3 \times 10^{-9}$  M;  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $4 \times 10^{-7}$  M;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$   $3 \times 10^{-8}$  M;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $1 \times 10^{-8}$  M;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $8 \times 10^{-8}$  M;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1 \times 10^{-8}$  M;



$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1 \times 10^{-6}$  M, provenite din soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare. Se verifică pH-ul și se aduce la pH 5,5 cu HCl 1 M sau NaOH 1 M. Toți reactivi folosiți sunt proveniți de la Merck-Millipore, Darmstadt, Germania. Orice alți reactivi care au aceleași caracteristici tehnice pot fi utilizați.

Mediul se inoculează cu 100 ml de suspensie bacteriană, din tulpina *Brevibacillus parabrevis* B50, NCAIM (P) B 001413, normalizate la  $10^9$  propagule per ml prin determinarea turbidității. Tulpina *Brevibacillus parabrevis* B50, din colecția INCDPC-ICECHIM, este cunoscută ca având efect de degradare a materiei organice (brevet EP 2765185 A2). Se cultivă tulpina B50 timp de 3 zile, la o rată de aerare de până la 50% saturație de oxigen, la temperaturii de incubare de 30°C.

Din 12 în 12 ore se prelevează aseptice probe de 2- 2,4 ml mediu de cultură cu microorganisme, în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Se separă prin centrifugare supernatantul, de sedimentul microbial, și se preiau probe de câte 1 ml de supernatant, care este diluat cu 4 ml apă ultrapură, în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber este determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Acest test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația absolută de acid silicic este calculată după construcția unei curbe de calibrare, folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). În mediu de cultură se determină o concentrație de acid ortosilicic care este permanent de sub 1 mM, fiind consecința a două procese concomitente – solubilizarea siliciului sub efectul metabolismului microbial și asimilarea acidului ortosilicic. În sedimentul de microorganisme se determină siliciu total, după mineralizare, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, *Geoderma*, 209: 251-261). Se constată o continuă creștere a conținutului de siliciu în biomasa de microorganisme, creștere care dovedește asimilarea acidului ortosilicic de către microorganisme.

După terminarea perioadei de cultivare se recoltează biomasa de microorganisme prin centrifugare la 10.000xg timp de 20 min, folosind o centrifugă Sorvall BIOS 16 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA 02451). Sedimentul rezultat este uscat în pat fluidizat, la temperaturi de 75-80°C, până la max. 1% umiditate reziduală, folosind un uscător în pat fluidizat MiniGlatt (Glatt, Binzen, Germania).



Se iau 6 grame de diatomită-bacterii care se încorporează în 94 grame de polilactidă (Ingeo, NatureWorks, Minnetonga, MN, SUA). Incorporarea se face prin omogenizare pe valț, folosind echipament cu două valțuri (Polymix 110L, Servitec, Wustermak), la temperatura de 180°C timp de 5 min.

Se introduce aseptice o bucată dezinfectată, de 1 x 1 cm, din compoziția rezultată, în 50 ml bulion nutritiv (D-glucoză, 1 g/l; peptonă, 15 g/l; clorură de sodiu, 6 g/l; extract de drojdie, 3 g/l). Se lasă peste noapte, iar a doua zi se scoate materialul plastic, se spală cu jet puternic de tampon fosfat salin, se usucă aseptice, se fixează prin imersare în alcool metilic 99% și se colorează cu cristal violet (conform metodei descrise de Peeters et al. 2008, *Journal of Microbiological Methods*, **72**, 157-165). Se observă formarea abundentă de biofilm specific pentru bacteriile gram pozitive care formează endo-spori. Se lucrează în paralel ca martor și cu un produs obținut numai prin amestecare pe valț a diatomitei cu polilactidă. Se constată că produsul format din cele două compozite PP (fără bacterii) nu formează biofilm.

Compoziția rezultată este utilizată pentru producerea de suporturi artificiale mobile, prin extrudere, conform procedurilor cunoscute.

*Exemplul 2.* Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește izolatul B52 de *Bacillus amyloliquefaciens*, din colecția INCDPC-ICECHIM, 5,5 grame de diatomită și 94,5 grame de polilactidă. Izolatul B52 are caracteristici de bioaugmentare, în special de degradare a hidrocarburilor aromatice. Se constată formarea biofilmului bacterian după incubare peste noapte în bulion nutritiv.

*Exemplu 3.* Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosesc 7 grame de diatomită și 93 grame de polilactidă.



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Salcu'.



## REVEDICĂRI

1. Compoziție pentru suporturi artificiale mobile, conform invenției, **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 5,5 – 7,0 grame diatomită, cu dimensiuni cuprinse între 30 și 40  $\mu\text{m}$ , minim 85% conținut de bioxid de siliciu și max. 1% bioxid de siliciu cristalin, 93 – 94,5 grame polilactidă și cel puțin  $10^9$  ufc bacterii endo-sporulate gram-pozitive.

- Procedul conform invenției caracterizată prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: cultivarea axenică a bacteriilor endo-sporulante gram-pozitive, cu capacitate de degradare a compușilor organici, pe medii minimale lichide, aerate și agitate, în care sunt incluse 5,5 -7,5 grame diatomită cu dimensiuni cuprinse, la pH optim și la aerări de până la 50% saturație de oxigen, și temperaturii de incubare de 30°C; recoltarea diatomitei și a biomasei de microorganisme prin centrifugare la 10.000xg timp de 20 min; uscarea în pat fluidizat a diatomitei și a biomasei de microorganisme, la temperaturi de 75-80°C, până la max. 1% umiditate reziduală; încorporarea diatomitei și a biomasei de microorganisme în poliactidă, 5,5 – 7,5 grame amestec de diatomită – sporii de bacterii gram pozitive cu 93 – 94,5 grame polilactidă, prin amestecare pe valț, la temperatura de 180°C timp de 5 min.


SOCIETATEA COMERCIALĂ  
EM  
ENVIRONMENTAL  
SOLUTIONS  
B.R.L.  
PRAHOVA - ROMANIA