



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00663

(22) Data de depozit: 05/11/2021

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. 5/2023

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

(72) Inventatori:
• RADU NICOLETA, STR.ZARZĂRILOR
NR.24B, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• CONSTANTIN MARIANA,
ȘOS.COLENTINA, NR.19, BL.OD57, ET.10,
AP.34, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• RĂUT IULIANA, ALEEA BARAJUL
BISTRIȚA NR.12, BL.4, SC.1, ET.4, AP.54,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• VASILESCU- PANEA GELU,
CALEA CRÂNGAȘI NR. 10, BL. 19A, ET. 1,
AP. 2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• GURBAN ANA-MARIA, STR.SG.NIȚU
VASILE NR.68, BL.26, SC.1, AP.30,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• JECU MARIA LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ, NR.6,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE MEDIU DE CULTURĂ PENTRU SPORULARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui mediu de cultură utilizat pentru stimularea sporulării speciei *Bacillus subtilis* care intră în compoziții de biopreparate din domeniul biotehnologiilor agricole și industriale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: realizare a unei soluții A conținând în părți în greutate 2 p.g. bulion nutritiv, 3 p.g. vinasă, 2,12 p.g. NaHCO₃, și 492,88 p.g. apă, care se sterilizează separată în autoclavă, sub presiune, timp de 15 min, la 134°C, realizare a unei soluții B conținând 22,1 p.g.

Ca(NO₃)₂·xH₂O, 28 p.g. CaCl₂, 2 p.g. uree și 447,9 p.g. apă, care se sterilizează prin trecerea prin filtre cu membrane de 0,2 μm, amestecarea soluțiilor A și B în părți egale, rezultând o compoziție de mediu de cultură pentru sporulare, care prin fermentare asigură formarea a (10⁷...10⁸)UFC/ml sub formă de spori de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, în 24 h.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 0663
Data depozit 05.11.2021

RO 137459 A2

18

COMPOZITIE MEDIU DE CULTURA PENTRU SPORULARE

Inventia se refera la o compozitie de mediu de cultura ce favorizeaza sporularea *Bacillus subtilis* ATCC6633.

Domeniul de aplicare al inventiei: biotehnologii agricole; biotehnologii industriale respectiv domeniile unde sunt necesare biopreparate ce necesita prezenta sporilor de *Bacillus subtilis* in concentratii situate intre $10^7 \div 10^8$ UFC/mL.

In ceea ce priveste aplicatiile mediilor de cultura ce contin spori de *Bacillus subtilis*, se cunoaste ca la adaugarea in compozitia betoanelor a unei solutii ce contine $10^7 \div 10^8$ spori/mL se obtine un material capabil de "autovindecare", ce consta in umplerea cu CaCO_3 a fisurilor ce pot sa apara la un moment dat in structura acestui material. Procesul de "autovindecare" are loc ca urmare a intrarii pe vegetatie a sporilor de *Bacillus subtilis*.

Utilizarea biopreparatelor ce contin spori de *Bacillus subtilis* ca agenti de biocontrol in agricultura, limiteaza pierderile culturilor agricole prin anulara atacului agentilor fitopatogeni, datorita biosintezei de substante antimicrobiene (fungicide) de catre formele vegetative de *Bacillus subtilis*, dezvoltate din spori.

Deoarece biopreparatele obtinute pe baza mediilor de cultura propuse contin spori (forme de rezistenta pentru microorgansime), ele pot fi utilizate direct in compozitiile de ciment "autoregenerante" sau la obtinerea de bioproduse cu rol in biocontrolul agentilor fitopatogeni.

In brevetul **CN103865826B** se furnizeaza o metoda de cultivare submersa pentru *Bacillus subtilis* in care se obtine la final un mediu de cultura cu continut mare de spori. Metoda cuprinde urmatoarele etape: obtinerea inoculului de *Bacillus subtilis* urmat de inocularea si fermentarea unui mediu de cultura in care se adauga componentii speciali pentru generarea de spori in timpul fermentatiei. Adaugarea componentului special in mediul de cultura imbunatateste substantial rata de formare a sporilor de *Bacillus subtilis* si face ca rata de formare a sporilor sa fie cu 15% mai mare, metoda imbunatatind substantial productivitatea.

Brevetul **JP4968816B2** propune pentru obtinerea unui mediu de cultura cu spori de *Bacillus sp.* urmatoarea metoda: obtinerea unui inocul ce contine *Bacillus sp.* dintr-un mediu de cultura lichid in care concentratia de oxigen dizolvat saturat este $>10\%$, urmat de utilizarea agentului de inoculare astfel obtinut in biosinteze submerse, in care concentratia totala de oxigen dizolvat in mediul de cultura este $\leq 10\%$ fata de concentratia de saturatie. Inventatorii recomanda ca limitarea concentratiei de oxigen dizolvat in mediul de cultura sa se realizeze in faza de crestere logaritmica sau in faza stationara.

Alt brevet **CN103627649B** propune un mediu de cultura pentru obtinerea de spori de *Bacillus subtilis* cu urmatoarea compozitie (exprimata in parti in greutate): 2...10 parti tarate de grau, 1...8 parti faina de porumb, 1...6 parti lactoză, 0,01...0,5 parti extract de carne de vita, 0,01...0,4 parti sulfat de amoniu, 0,01...0,5 parti hidroxid de sodiu, 20...40 parti extract apos de *Radix astragali*, si 50...74 parti apa dublu distilata.

Brevetul **CN102199569B** propune pentru obtinerea de medii lichide bogate in spori de *Bacillus subtilis* o compozitie alcatuita din faina de grau (0,8... 1,5%) si tarate macinate (1,5%...4%). Dupa o fermentatie de (40+48) h se obtine un mediu de cultura ce contine (3,8...4,50) $\times 10^7$ UFC/mL, sub forma de spori (UFC= unitati formatoare de colonii).

Exemplele din stadiul cunoscut al tehnicii prezentate mai sus prezinta ca principale dezavantaje pe de o parte utilizarea ca surse de nutrienti a unor componente care nu sunt disponibile (extract apos de *Radix astragali*,) fie sunt compusi indezirabili pentru unele aplicatii industriale (sulfat de amoniu, faina de grau, tarate de grau, faina de soia), fie necesita pentru obtinere un bioreactor prevazut cu barbotare de oxigen fie necesita un interval de timp mare (40-48 h) pentru sporulare.

Compozitia conform inventiei, inlatura dezavantajele mentionate prin aceea ca aceasta contine: bulion nutritiv: 0.15-2%; vinasa: 0...0,3%; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$: 0,2%; CaCl_2 : 2,8%; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 2,21% si are urmatoarele caracteristici; continut C_{total} = 0,096%...0.097%; continut N_{total} : 0.366%...0.368% continut Ca_{total} : 1.378%...1.381%; continut Na_{total} : 0.058%; continut de Cl_{total} : 1.79%

În condiții de limitare extremă a nutrienților, *Bacillus subtilis* suferă un proces de diferențiere care transformă celula bacteriană într-o stare latentă de spor, foarte rezistent la solicitări fizico-chimice. Sporii sunt eliberați la sfârșitul dezvoltării procesului prin liza celulei mamă; mai târziu, în condiții prielnice, (umiditate, nutrienți) aceștia pot iniția germinația, care conduce din nou la creșterea vegetativă. Mediile de cultura pentru sporulare reprezintă produse utile în agricultură și tehnică

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în realizarea unui mediu de cultura, care prin fermentație asigură formarea a (10^7+10^8) UFC /mL sub forma de spori de *Bacillus subtilis* ATTC 6633, în timp scurt, respectiv în 24 h.

Compozitia mediului de cultura propus pentru obtinerea unor biopreparate lichide cu continut ridicat de spori de *Bacillus subtilis* conform inventiei este constituita din: bulion nutritiv: 0,15...0,2% (compozitie bullion nutritiv: N_{total} : 3,19%; C_{total} : 2,44%); vinasa: 0...0,3% (vinasa utilizata este un mediu de cultura epuizat, rezultat din fermentatia drojdiei de bere, ce contine: C_{total} : 7,29%; N_{total} : 2,85%; Ca_{total} : 0,66%); NaHCO_3 : 0,212%; CaCl_2 : 2,8%; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$: 0,2%; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 2,21% (azotatul de calciu tetrahidrat utilizat este un produs secundar ce rezulta din tehnologia de obtinere a ingrasamintelor complexe).

Avantajele compozitiei mediului de cultura pentru sporulare propus consta in:

- reducerea timpului de fermentatie;
- obtinerea unei concentratii ridicate de unitati formatoare de colonii (UFC) sub forma de spori pe mL mediu de cultura (10^7+10^8 UFC/mL);
- respectarea principiilor bioeconomiei circulare, prin utilizarea unui deșeu rezultat dintr-o biotehnologie, ca materie prima în alta biotehnologie;
- introducerea în circuitul economic a vinasei (mediu de cultura epuizat de la fermentatie) rezultate din biotehнологia de obtinere a drojdiei de bere;

- utilizarea unui subprodus secundar ce rezulta din tehnologia ingrasamintelor complexe (respectiv $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), in biotehnologii ;
- limitarea poluarii factorilor de mediu cu medii de cultura epuizate rezultate din biotehnologiile de obtinere a drojdiei de bere.

Se dau in continuare 2 exemple de realizare a compozitiei conform inventiei.

Pentru obtinerea a 1000 g compozitie mediu de cultura se folosesc:

Exemplul 1:

- bulion nutritiv...2 g
- vinasa ...3 g
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$...22,1 g
- NaHCO_3 ...2,12g
- CaCl_2 ...28 g
- $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$...2g
- Apa distilata ...940.78 g

Aceasta compozitie prin inoculare cu *Bacillus subtilis* ATTC6633 conduce dupa 24 h de fermentatie intr-un incubator cu agitare si termostatare la obtinerea unei solutii ce contine 10^8 UFC/mL sub forma de spori.

Exemplul 2;

- bulion nutritiv... 1,5 g
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$...22,1 g
- NaHCO_3 ...2,12g
- CaCl_2 ...28 g
- $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$...2g
- Apa distilata:...944.28 g

Aceasta compozitie prin inoculare cu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 conduce dupa 24 h de fermentatie intr-un incubator cu agitare si termostatare, la obtinerea unei solutii ce contine 10^7 UFC/mL sub forma de spori.

Au fost efectuate teste de laborator care au evidentiat capacitatea compozitiilor mediilor cultura prezentate de a stimula sporularea speciei *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in vederea utilizarii acestora in biotehnologiile industriale.

Pentru obtinerea compozitiei mediului de cultura pentru sporulare se parcurg urmatoarele etape:

1) Se realizeaza o solutie ce contine 2 g bullion nutritiv, 3 g vinasa, 2,12 g NaHCO_3 si 492.88 g apa, care se sterilizeaza separat in autoclav, sub presiune, timp de 15 minute la 134°C (solutia A);

2) Se realizeaza o solutie ce contine 22,1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 28 g CaCl_2 ; 2 g uree si 447,9 g apa, care se sterilizeaza prin trecerea prin filtre cu membrane de 0.2 μm (solutia B);

Compozitia mediului de cultura pentru sporulare se obtine prin amestecarea solutiei A cu solutia B in parti egale.

In urma combinarii solutiei A cu solutia B se obtine o compozitie de mediu de cultura pentru sporulare cu urmatoarele caracteristici; continut C_{total} : 0,097%; continut N_{total} : 0.368% continut Ca_{total} : 1,381%; continut Na_{total} : 0,058%; continut de Cl total: 1,79%

REVEDICARI

Compozitie mediu de cultura pentru sporulare caracterizata prin aceea ca aceasta contine: bulion nutritiv: 1,5...2 g/L; vinasa: 0...3 g/L; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$: 2g/L; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 22,1g/L, si are urmatoarele caracteristici: continut C_{total} = 0,096%...0.097%; continut N_{total} : 0.366%...0.368% continut Ca_{total} : 1.378%...1.381%; continut Na_{total} : 0.058%; continut de Cl_{total} : 1.79%.