

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00245**

(22) Data de depozit: **09/05/2022**

(41) Data publicării cererii:
29/11/2023 BOPI nr. **11/2023**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN CLUJ-
NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR NR.3-5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• CLAPA DOINA, STR. TARNIȚA NR.5,
AP.6, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• POP VIOREL CORNEL, PIAȚA ABATOR,
BL.B, AP.22, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• HÂRȚA MONICA, STR.PRINCIPALĂ,
NR.679, GILĂU, CJ, RO

(54) **BIOREACTOR CU UNITATE DE DECIZIE ȘI CONTROL
DIGITALIZATĂ DESTINAT MICROPROPAGĂRII PLANTELOR
(TIBS-D)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată, destinat laboratoarelor de micro-propagare pentru producerea de material săditor sau biomasă pentru producția de metaboliți secundari. Bioreactorul, conform invenției, este compus dintr-o unitate de bază (UB) sau unitatea sterilă formată dintr-un vas (1) din material transparent, cum ar fi policarbonat, poli-propilenă, o sită (2) pentru inocularea plantelor sau o tavă alveolară (8) pentru etapa de înrădăcinare, un capac (3), un tub (4) prevăzut cu un sorb (5) pentru absorbția mediului de cultură, o duză (6) de pulverizare a mediului de cultură și o bază (7) de pompă peristaltică, și dintr-o unitate de control și decizie (UCD) sau componenta nesterilă formată dintr-o carcasă (9), care se fixează pe componenta sterilă, un cap presor (11) de pompă peristaltică, un motor pas cu pas (13) având un ax (12), un capac superior (15) cu fante pentru o unitate de comandă (14) și o sursă de alimentare cu 12 Vcc (16).

Revendicări: 4
Figuri: 6

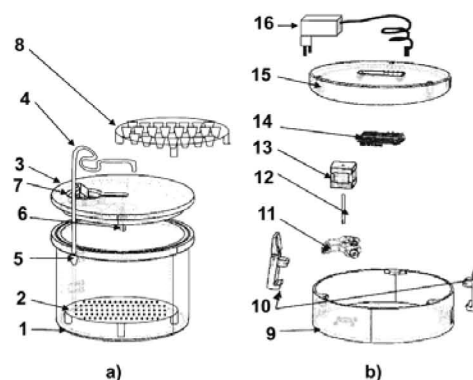
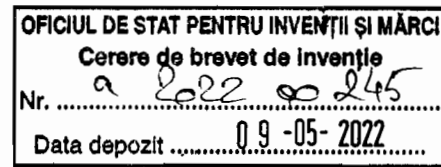


Fig. 3





BIOREACTOR CU UNITATE DE DECIZIE ȘI CONTROL DIGITALIZATĂ DESTINAT MICROPROPAGĂRII PLANTELOR (TIBS-D)

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un bioreactor dotat cu unitate de decizie și control digitalizată destinat laboratoarelor de micropropagare pentru producerea de material săditor sau biomasă pentru producția de metaboliți secundari.

Este cunoscut că bioreactoarele sunt sisteme de cultură in vitro semiautomatizate sau complet automatizate, bazate pe cicluri alternative de imersie temporară a țesutului vegetal în mediu lichid, urmat de drenarea și expunerea țesutului la un mediu gazos. Ele au fost create ca o alternativă la culturile in vitro pe medii semi-solide cu scopul de a reduce costul final al plantelor prin reducerea costurilor cu forța de muncă și eliminarea agarului din mediile de cultură.

O serie de cercetări arată că progresul în automatizarea culturilor in vitro va depinde de realizarea culturilor in vitro în medii lichide prin utilizarea tehnicilor inovatoare bazate pe sisteme temporare de imersie (TIS) (Gianguzzi et al., 2019). Aceste sisteme asigură un contact mai mare între cultura în creștere și mediul de cultură, permițând astfel unui număr mai mare de plante să se propage în timp mai scurt și spațiu restrans. Mai mult, comparativ cu sistemele care folosesc un mediu solid, sistemele cu imersie temporară (TIS) permit o absorbție mai mare de nutrienți și o aerare mai bună în mediul in vitro (Alvard et al. 1993; Zobayed et al 2003).

Este cunoscut faptul că în ultimele decenii au fost descrise mai multe sisteme de imersie temporară (TIS) pentru biotehnologia plantelor (Georgiev 2014):

Sistemul Twin-Flask [Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)] - este unul dintre primele TIS dezvoltate (Watt, M. P. 2012; Escalona et al. 1999; Lyam et al. 2012). Este format din două recipiente (baloane cu gură largă, sticle sau borcane), conectate între ele printr-o conductă U (sticlă sau plastic) sau un tub din silicon (Aragón et al. 2010; Yang et al. 2010).

Sistemele Ebb-and-Flow ar putea fi descrise ca o modificare simplificată a sistemelor Twin-Flask.

Sistemul RITA - (CIRAD, Franța, distribuit de VITROPIC, Franța) - a fost dezvoltat special pentru cultura plantelor in vitro și este format dintr-un singur vas de polipropilenă autoclavabilă (500 ml) cu două compartimente.

Thermo-photo-bioreactor - a fost creat special pentru producerea de metaboliți secundari pentru *Deschampsia antarctica* din Antarctica (Navarro et al. 2011) și are o construcție complexă și costisitoare.

Ebb-and-flow hibrid - cu flux convectiv tubular saturat a fost dezvoltat exclusiv pentru cultivarea culturilor de rădăcini păroase cu o mare densitate (Cuello et al. 2008).

Bioreactorul cu imersie de bule (BIB) utilizează imersia temporară a explantelor propagate în spumă în loc de lichid (Scheidt et al., 2011).

Sistemele balansoare - folosesc o platformă mecanică pentru a înclina cutiile de cultură (Adelberg, et al. 2004; Kämäräinen-Karppinen et al. 2010; Uchendu, et al. 2011).

Sistem cu tambur rotativ - este format dintr-un aparat cu role și o sticlă de plastic sau sticlă autoclavabilă care se află pe el (Akita et al. 1998). Când aparatul cu role se rotește cu viteză mică, plantele imobilizate sunt cufundate periodic și expuse mediului aerian.

BOX-IN-BAG este un TIS de unică folosință, care funcționează pe principiul TIS Ebb-and-Flow (Ducos et al 2010)

Bioreactorul WAVE este o platformă cu balansare mecanică care folosește pungi de cultivare pre-sterilizate de unică folosință (Eibl and Eibl, 2006, 2008; Eibl et al., 2009).

În încercarea de a reduce costurile investiției inițiale pentru echipamente și de a economisi spațiu și forță de muncă sunt disponibile pe piață mai multe TIS, cum ar fi:

PLANTFORM (Plant Form AB, Suedia & TC propagation Ltd., Irlanda) <https://www.plantform.se/pub/shop.aspx>

PLANTIMA (A-Tech Bioscientific Co., Ltd., Taiwan) <https://vietsci.com/san-pham/tu-cay-tu-hut-tu-an-toan-sinh-hoc/he-thong-nuoi-cay-ngap-chim-tam-thoi-plantima.html>

RALM (Biorreatores RALM, Ralm Industria e Comércio Ltda., Brazilia - <https://www.ralmindustria.com/equipamentos>

RITA - (CIRAD, Franța, distribuit de VITROPIC, Franța), <https://vitropic.pagesperso-orange.fr/rita/index.htm>

SETIS (Vervit, Belgia) <http://www.vervit.be/products/technologies>

Bioreactorul cu imersie de bule – BIB (Tecnal Equipamentos para Laboratorio, Brazil), https://tecnal.com.br/ptBR/produtos/detalhes/6489_biorreator_de_imersao_temporaria_por_bolhas

Ca urmare a celor enumerate mai sus se poate constata că bioreactoarele dezvoltate pînă în prezent se concentrează pe sistemul de imersie temporară (TIS) fiind alcătuite din vasele de cultură și un bloc de control. Vasele de cultură, realizat dintr-un material transparent (sticlă sau plastic),

reprezintă zona aseptică a bioreactorului în care se dezvoltă plantele în mediul de cultură steril iar blocul de control controlează condițiile din vasul de cultură, respectiv timpul de imersie, aerarea, nivelul mediului lichid, nivelul oxigenului și a dioxidului de carbon. Din punct de vedere al vaselor de cultură distingem două tipuri de bioreactoare: cele de tip RITA la care mediul de cultura și suportul pentru plante se afla într-un singur vas și cele de tip BIT caracterizate prin aceea că sunt formate din două vase alăturate, unul pentru plante și altul pentru mediile de cultură.

Toate aceste tipuri de bioreactoare au la bază un sistem mecanic sau pneumatic, unitățile sunt legate între ele cu ajutorul unei tubulaturi conectate la pompe iar timpul de imersie este reglat cu ajutorul unor timere. Unitățile componente ale sistemelor (bioreactoarele) nu pot fi personalizate, setarea parametrilor făcându-se de la un singur bloc de control pentru tot sistemul. La toate bioreactoarele existente pe piață mediul lichid, acționat de pompe, scaldă explantele fiind împins de aer, apoi prin forța gravitațională mediul de cultură revine în recipientul sau zona destinată mediului. În timpul acestui proces explantele sunt deplasate din locul în care au fost inoculate astfel că distribuția lor în interiorul vasului de cultură devine neuniformă.

Exemple de bioreactoare sunt descrise în mai multe brevete și lucrări științifice, după cum urmează:

Brevetul de invenție BR212016010698 (U2) - 2016-08-16 prezintă un bioreactor, recomandat în special pentru eucalipt, format din două compartimente suprapuse, cel superior destinat inoculării plantelor și cel inferior destinat mediului de cultură. Mediul de cultură intra în contact cu plantele printr-o acționare pneumatică. În plus, acest bioreactor este prevăzut cu filtru de aer, umidificator și sursă de iluminare.

Brevetul de invenție WO9625484A1 - 1996-08-22 prezintă un recipient destinat culturilor in vitro prin imersie temporară format dintr-un corp unitar, respectiv o carcasă exterioară închisă cu capac, prevăzută cu un coș care separa recipientul în două părți: partea superioară destinată inoculării țesuturilor vegetale și partea inferioară destinată depozitării mediului nutritiv lichid. Imersarea plantulelor cu mediul lichid se face prin conectarea vasului la o pompă care, printr-un orificiu de admisie situat în capac, furnizează o suprapresiune în recipient, suprapresiune care este condusă în partea inferioară printr-un tub care se deschide într-un clopot și ridică mediul lichid la nivelul plantulelor din compartimentul superior. Când timerul deconectează pompa, presiunea scade iar mediul lichid coboară în compartimentul inferior.

Brevetul de invenție WO2012146872 (A1) — 2012-11-01 propune un recipient pentru cultura in vitro de material vegetal, prin imersie temporară, care funcționează într-o manieră similară cu cea descrisă în documentul WO9625484A1 (cunoscut sub denumirea RITA) dar se deosebește de acesta prin forma și volumul celor două compartimente. Astfel, partea inferioară a camerei superioare, destinată materialului vegetal, are o suprafață orizontală cuprinsă între 0.02 și 0.07 m² iar fața laterală a camerei superioare are o înălțime cuprinsă între 40 și 130 mm. Cu alte cuvinte, raportul suprafață orizontală (în m²)/înălțime (în m) al camerei superioare a containerului trebuie să fie între aproximativ 0.50 și 1.75.

Robert și colaboratorii (2006) descriu un nou tip de bioreactor numit BioMINT care este un bioreactor de dimensiuni medii (1.2 l) ce funcționează pe principiul imersiei temporare. Este alcătuit din două vase din polipropilenă, transparente și autoclavabile, un vas fiind destinat pentru plante și celălalt pentru mediile de cultură lichide. Ele sunt cuplate împreună printr-o piesă adaptor perforată ce permite curgerea mediului lichid dintr-un vas în altul. Trecerea lichidului dintr-un vas în altul este asigurată printr-o mișcare de balansare realizată cu ajutorul unei platforme care își schimbă poziția prin intermediul unui motor electric.

Businge și colaboratorii (2017) prezintă un nou sistem de bioreactor care constă dintr-un vas de cultură rotund (cu diametrul de 125 mm și o înălțime de 45 mm) și o sticlă de 500 ml pentru păstrarea mediului lichid. Cu ajutorul unei pompe de aer comprimat mediul lichid din sticle este împins în sus în vasele de cultură, scufundând astfel explantele în mediu pentru o durată prestabilită. Odată ce pompa este oprită mediul de cultură curge înapoi în sticlele pentru medii cu ajutorul forței de gravitație deoarece vasele de cultură sunt plasate pe rafturi situate la un nivel deasupra sticlelor cu mediu. Autorii au realizat culturi in vitro în acest tip de bioreactor pentru *B. pendula*, *B. pubescens*, *E. grandis* x *E. Urophylla* și *A. nordmanniana*.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în aceea că bioreactorul dotat cu unitate de decizie și control digitalizată este un bioreactor mai ușor de manevrat pentru cultura in vitro a plantelor fiind un sistem automat, autonom, cu un program personalizabil pentru fiecare unitate în parte, dotat cu un sistem de monitorizare și afișare propriu, fiind fără bloc de control. Bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată aduce mediul de cultură în contact cu inoculii de sus în jos, prin intermediul duzei de pulverizare astfel că inoculii își păstrează distribuția pe sita suport fără a fi îngrămădiți în anumite zone ale bioreactorului așa cum se întâmplă în cazul celorlalte tipuri de bioreactoare.

În raport cu stadiul tehnicii, prin aplicarea invenției, sunt depășite total sau parțial mai multe limitări: este un bioreactor mai ușor de manevrat pentru culturile in vitro; sistemul este format din unități independente, bioreactoarele nu sunt legate între ele prin tubulaturi și nu este nevoie de un bloc de control al sistemului; unitatea de control și de decizie se atașează pe fiecare bioreactor în parte cu ajutorul unui sistem simplu de prindere, această operațiune având loc în hota cu flux laminar de aer steril după inocularea explantelor și închiderea unității de bază a bioreactorului cu capacul propriu. Acest lucru permite, în cazul unor defecțiuni, schimbarea separată a componentelor; unitatea de control și de decizie este individuală pentru fiecare bioreactor, unitatea poate fi personalizată foarte ușor în timpul derulării unui ciclu de cultură prestaibil; unitatea de control și de decizie poate fi interconectată cu alte componente digitale, acest lucru se poate realiza foarte ușor fie prin portul USB sau prin rețelele de tip bluetooth sau Wi-Fi incluse (opțional), în bioreactorul digital (aceste rețele permit monitorizarea și comanda de la distanță, printr-un protocol de tip server, pentru toate bioreactoarele de acest tip dintr-o cultură); programarea și ajustarea parametrilor se face direct pe tastatura display-ului LCD sau indirect prin portul USB sau a rețelelor wireless mai sus amintite.

În continuare este prezentată pe larg invenția. Bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropropagării plantelor (Fig 1), conform invenției, este format din două componente principale: unitatea de bază (UB) sau vasul de cultură al bioreactorului (Fig. 2a) și unitatea de control și de decizie (UCD) (Fig. 2b).

Unitatea de bază a bioreactorului (UB) sau componenta sterilă (Fig.3a) este formată din vasul bioreactorului 1 confecționat dintr-un material transparent autoclavabil (polycarbonat, polipropilenă), sita pentru inocularea explantelor 2, capacul 3, tubul de absorbție a mediului de cultură 4 prevăzut cu sorb 5, duza de pulverizare a mediului de cultură 6 și baza pompei peristaltice 7. Pentru etapa de înrădăcinare sita 2 va fi înlocuită cu tava alveolară 8.

Unitatea de control și decizie (UCD) sau componenta nesterilă (Fig. 3b) este amplasată pe capacul 3 unității de bază (UB) și este un sistem compact format din: carcasa 9 cu două cleme de fixare 10 pe UB, capul presor 11 al pompei peristaltice, axul motorului 12, motorul pas cu pas 13, capacul superior cu fantă 15 pentru unitatea de comandă 14 (formată din placa de dezvoltare Arduino, modul I602 LCD keypad Shield, driver pentru motor) și sursa de alimentare cu 12 Vcc 16. UB este componenta cea mai voluminoasă a bioreactorului, reprezintă baza bioreactorului și este formată dintr-un vas cilindric transparent cu fundul plat pentru a susține întreaga greutate a

bioreactorului cu înălțimea și diametrul variabile. Mediul de cultură lichid se introduce în UB într-o cantitate care să nu depășească nivelul sitei 2, se închide ermetic cu capacul 3 după care se sterilizează în autoclav la 121°C și 1 atm sau alți parametri în funcție de volumul de mediu de cultură. După autoclavare și răcire UB se introduce în hota cu flux laminar de aer steril, se deschide capacul 3 și se inoculează explantele pe sita suport 2 a unității de bază după care se închide capacul 3 astfel încât sorbul 5 tubului de absorbție 4 să fie introdus în mediul de cultură. Următoarea operațiune constă în atașarea celei de-a doua unități a bioreactorului, respectiv a UCD peste capacul 3 al UB. UCD se va fixa peste capacul 3 al UB cu ajutorul celor două cleme de fixare 10 astfel încât capul presor al pompei peristaltice 11 să fie introdus în baza pompei peristaltice 7 unde se află tubul de absorbție a mediului de cultură 4. Pompa peristaltică va fi acționată de un motor pas cu pas 13 aflat de asemenea în carcasa 9 a UCD. După asamblarea celor două părți (UB și UCD) urmează a treia operațiune, respectiv setarea parametrilor de funcționare ai bioreactorului. Pentru setarea parametrilor pe carcasa UCD este montată unitatea de comandă 14 care este formată din modul 1602 LCD Keypad Shield, placa de dezvoltare Arduino și driver pentru motor. Operatorul va stabili timpul de pulverizare al mediului de cultură peste explante (respectiv timpul de funcționare al pompei peristaltice) precum și periodicitatea acestor timpi de pulverizare direct pe tastatura display-ului LCD cu ajutorul celor 6 taste prezentate în figura 4: tasta Sus 17, tasta Jos 18, tasta Dreapta 19, tasta Stânga 20, tasta Select 21 și tasta Reset 22. Pentru utilizarea cu succes a unui ciclu complet, operatorul trebuie să stabilească cât timp dorește să pulverizeze pompa mediul de cultură peste explante, acesta este timpul setat la comanda afișată: On Timer Mode M 00:00:00. Pe lângă acest parametru se dorește stabilirea timpului în care pompa este oprită, care se va seta în momentul în care pe ecranul LCD apare mesajul: Off Timer Mode H 00:00:00. Apoi ciclul se va repeta în buclă periodic, până bioreactorul va fi oprit. În continuare, se dă un exemplu de setare a bioreactorului astfel încât mediul de cultură să fie pulverizat peste explante timp de un minut la fiecare oră. După conectarea bioreactorului la sursa de curent, pe ecranul LCD al bioreactorului va apărea următorul mesaj: BIOREACTOR TIMER MENU, iar după 10 secunde ecranul LCD va afișa la prima pornire următorul mesaj: Off Timer Stop 255:255:255. Din acest meniu se vor opera următoarele setări:

Se acționează tasta Dreapta până la apariția mesajului: On Timer Mode S - 255:255:255, iar apoi acționăm tasta Stânga pentru a schimba litera S (secunde) din finalul rândului superior, în M (minute).

Cu ajutorul săgeții sus și jos se modifică timpul (minutarul în cazul nostru) pentru a seta timpul în care pompa este pornită. Pentru exemplul propus trebuie setat timpul la un minut, deci după setarea corectă, mesajul de pe ecranul LCD, va fi: On Timer Mode M 00:01:00.

Se acționează apoi, tasta Dreapta schimbăm modul de operare, respectiv până va afișa: Off Timer Mode S 00:00:00, apoi se acționează tasta Stânga până ce ecranul LCD va afișa la sfârșitul rândului superior, în loc de S va afișa H. Iar cu ajutorul tastelor Sus și Jos se schimbă timpul în care pompa va fi oprită, adică o oră conform exemplului propus. Dacă setarea s-a realizat corect, atunci pe ecranul LCD, va fi afișat următorul mesaj: Off Timer Mode H 01:00:00.

În continuare se va bloca această setare prin acționarea tastei Select și apoi tasta Reset. Bioreactorul va reporni, va afișa pe rând mesajele: BIOREACTOR TIMER MENU iar după 10 secunde ecranul LCD va afișa la prima pornire următorul mesaj: On Timer Mode M 00:01:00.

În continuare se va acționa tasta Sus pentru pornirea ciclului de micropropagare, bioreactorul va începe bucla programată cu pompa pornită, respectiv, timp de un minut la aceste setări și va opri pompa apoi, timp de o oră ciclul se va relua automat în buclă fără oprire. Ciclul se poate opri în orice moment prin acționarea tastei Jos.

Pentru modificarea acestor setări (după o primă setare prealabilă) se urmăresc pașii de la 1 la 5 cu mențiunea că în loc de mesajul de început: Off Timer Stop 255:255:255 va începe setarea de la mesajul: On Timer Mode M 00:01:00.

În figura 5 este prezentată schema cu modul de conectare a componentelor din circuitul logic și de comandă format din sursa de 12 V cc, 2 A - 16, condensator electrolitic 220 μ F/16V - 25, placa de dezvoltare Arduino uno 14, 1602 LCD Keypad Shield 23 și driverul 24 pentru motorul pas cu pas 13. Codul sursă a fost realizat conform schemei logice pentru algoritmul de scriere a acestuia, cel din figura 6 și apoi se încarcă cu ajutorul programului Arduino 1.6.8. prin portul usb în placa de dezvoltare a modulului Arduino Uno, în următoarea etapă se efectuează asamblarea plăcii de dezvoltare Arduino Uno cu 1602 LCD Keypad Shield și se realizează toate conexiunile conform figurii 5.

Scurtă descriere a desenelor:

Figura 1 – ilustrează bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropropagării plantelor

Figura 2 – ilustrează cele două componente principale: unitatea de bază (UB) sau vasul de cultură al bioreactorului (a) și unitatea de control și de decizie (UCD) (b).

Figura 3 – ilustrează unitatea de bază a bioreactorului (UB) sau vasul de cultură al bioreactorului (componenta care se sterilizează) și unitatea de control și decizie (UCD sau componenta nesterilă) cu toate părțile componente detaliate.

Figura 4 – ilustrează distribuția tastelor pe modulul 1602 LCD Keypad Shield

Figura 5 – ilustrează componentele și modul lor de conectare din circuitul logic

Figura 6 – ilustrează schema logică pentru algoritmul de scriere a codului încărcat în platforma de dezvoltare Arduino.

Bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată poate fi utilizat în următoarele cazuri: pentru etapa de multiplicare în vitro, caz în care se va folosi sita 2; pentru etapa de înrădăcinare in vitro, caz în care sita 2 se va înlocui cu tava alveolară 8.

Se dau în continuare câteva exemple de utilizare a bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată. Bioreactorul testat a avut următoarele caracteristici: volum unitate de bază: 3,5 l, dimensiuni unitate de bază: h= 10cm, Ø = 23cm, sursa de alimentare cu 12 Vcc, restul parametrilor sunt prezentați pentru fiecare caz în parte

Micropropagarea steviei (*Stevia rebaudiana*) in bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată (TIBS-D). S-a utilizat mediul de cultură Murashige and Skoog, 1962 (MS) având în compoziție micro și macroelemente în concentrație întreagă, Myo-inositol 100 mg/l, Thiamine 1 mg/l, Pyridoxine 0,5 mg/l, Acid nicotinic 0,5 mg/l și 30 g l/zahar, fără regulatori de creștere. pH-ul mediilor a fost ajustat la 5,8 înainte de autoclavare. Cantitatea de mediu distribuită în fiecare bioreactoar a fost de 500 ml. Autoclavarea mediilor de cultură s-a făcut la 0,11 MPa și 121 ° C timp de 20 de minute iar componentele au fost adăugate înainte de autoclavare. S-au inoculat 25 minibutași/bioreactor constând în fragmente de lăstari cu un nod. Timpul de pulverizare a inoculilor cu mediul de cultură a fost de 1 minut la două ore. Culturile au fost menținute în camera de creștere la o fotoperioadă de 16 ore lumina/8 ore întuneric cu o intensitate luminoasă de $32.4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Philips CorePro LED tube 1200 mm 16W865 CG, 1600lm Cool Daylight), o temperatură de $23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ și $50 \pm 2\%$ umiditate. Durata culturilor in vitro a fost de 30 de zile. Toti inoculii au fost viabili si au regenerat lăstari cu o lungime medie de $63,16 \pm 1,85 \text{ mm}$ și o greutate medie de $154,74 \pm 8.75 \text{ mg}$.

Micropropagarea mentei (*Mentha piperita*) in bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată (TIBS-D). Mediile și condițiile de cultură au fost similare cu cele descrise la stevia (punctul 21). După o lună de cultură in vitro plăntuțele au fost scoase din mediile de cultură

și s-au măsurat numărul de lăstari/inocul, lungimea lăstarilor, numărul de rădăcini/plantulă și lungimea rădăcinilor. Numărul mediu de lăstari/inocul a fost de $2,1 \pm 0,06$ având o lungime medie de $10,6 \pm 0,66$ cm, Numărul mediu de rădăcini/plantulă a fost de $3,8 \pm 0,13$ cu o lungime medie de $3,7 \pm 0,21$ cm.

Micropropagarea portaltoiului de cireș Gisela 6 (*Prunus cerasus* X *Prunus canescens*) în bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată (TIBS-D). Mediul de cultură utilizat pentru cultura in vitro a fost MS având în compoziție micro și macroelemente în concentrație întreagă, Myo-inositol 100 mg/l, Thiamine 1mg/l, Pyridoxine 0,5 mg/l, Acid nicotinic 0,5 mg/l, 30 g l/zahar și suplimentat cu 0.4 mg/l 6-benziyladenine (BA). pH-ul mediilor a fost ajustat la 5,8 înainte de autoclavare. Cantitatea de mediu distribuită în fiecare bioreactor a fost de 500 ml. Autoclavarea mediilor de cultură s-a făcut în vasele de cultură la 0,11 MPa și 121 ° C timp de 20 de minute, toate componentele au fost adăugate înainte de autoclavare. După răcirea mediilor de cultură s-a trecut la inocularea minibutașilor în hota cu flux laminar de aer steril și s-au inoculat câte 20 minibutași/bioreactor iar timpul de pulverizare a inoculilor cu mediul de cultură a fost de 1 minut la două ore. Culturile au fost menținute în camera de creștere la o fotoperioadă de 16 ore lumina/8 ore întuneric cu o intensitate luminoasă de $32.4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Philips CorePro LED tube 1200 mm 16W865 CG, 1600lm Cool Daylight), o temperatură de 23 ± 3 ° C și $50 \pm 2\%$ umiditate. Durata culturilor in vitro a fost de 30 de zile. Rata medie de proliferare/inocul obținută a fost de $1,66 \pm 0,18$ iar lungimea medie a lastarilor proliferați a fost de $2,55 \pm 0,36$ cm. De menționat este faptul că s-au obținut lăstari fără urme de vitrificare.

Micropropagarea căpșunului (*Fragaria x ananassa* Duch.), soiul Tecla în bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată (TIBS-D). Mediul de cultură utilizat pentru cultura in vitro la căpșun a fost MS având în compoziție micro și macroelemente în concentrație întreagă, Myo-inositol 100 mg/l, Thiamine 1mg/l, Pyridoxine 0,5 mg/l, Acid nicotinic 0,5 mg/l, 30 g l/zahar în două variante, respectiv suplimentat cu 0,2 mg/l 6-benziyladenine (BA) și cu 0,4 mg/l BA. Restul parametrilor au fost cei descriși la punctul 21. S-au inoculat câte 20 minibutași/bioreactor. După de 30 de zile de cultură rata de multiplicare/inocul a fost de $5,2 \pm 0,76$ pe mediul de cultură suplimentat 0,4 mg/l BA iar reducerea concentrației de BA la 0,2 mg/l a dus la obținerea unei rate de multiplicare de $5,4 \pm 0,76$. Lungimea medie a lăstarilor proliferați a fost de $2,0 \pm 0,56$ cm pe mediul de cultură suplimentat 0.4 mg/l BA și aceasta scăzut la $1,7 \pm 0,06$ cm pe mediul de cultură suplimentat cu 0,2 mg/l BA.

Importanța practică a invenției constă în aceea că bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată este mai ușor de manevrat pentru culturile in vitro deoarece fiecare unitate este independentă, unitățile nu sunt unite între ele prin tuburi și nu sunt comandate de la un singur bloc de control. Bioreactorul cu unitate de decizie și control digitalizată, prin intermediul celor două variante de tăvi (2 respectiv 8), permite atât utilizarea lor în etapa de multiplicare in vitro cât și în etapa de înrădăcinare in vitro. Bioreactorul poate fi utilizat în laboratoare pentru cercetare și în laboratoarele pentru producția de material săditor obținut prin micropropagare.

Literatura citată:

Adelberg, J., Toler, J. Comparison of agar and an agitated, thin-film, liquid system for micropropagation of ornamental elephant ears. *HortScience* 2004, 39, 1088-1092

Akita, M., Ohta, Y. A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Rep.* 1998, 18, 284-287.

Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32(1), 55-60.

Aragón, C., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M., *et al.* Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 2010, 46, 89-94.

Cuello, J. L., Yue, L. C., Ebb-and-Flow bioreactor regime and electrical elicitation: Eovel strategies for hairy root biochemical production. *Electron. J. Integr. Biosci.* 2008, 3, 45–56.

Ducos, J.-P., Terrier, B., Courtois, D., Disposable bioreactors for plant micropropagation and mass plant cell culture, in: Eibl, R., Eibl, D. (Eds.), *Disposable Bioreactors*, Springer, Berlin Heidelberg, Germany 2010, pp. 89–115.

Eibl, R., Eibl, D. Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture, in: Gupta, S. D., Ibaraki, Y. (Eds.), *Plant Tissue Culture Engineering*, Springer Netherlands 2006, pp. 203-227.

Eibl, R., Eibl, D. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochem Rev.* 2008, 7, 593-598.

Eibl, R., Werner, S., Eibl, D. Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale. *Eng. Life Sci.* 2009, 9, 156-164.

Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., *et al.* Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 1999, 18, 743-748.

- Gianguzzi, V., Inglese, P., Barone, E., & Sottile, F. (2019). In Vitro Regeneration of *Capparis spinosa* L. by Using a Temporary Immersion System. *Plants*, 8(6), 177.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*, 14(6), 607-621.
- Kämäräinen-Karppinen, T., Virtanen, E., Rokka, V. M., Pirttilä, A. M. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2010, 101, 245-249
- Lyam, P. T., Musa, M. L., Jamaledine, Z. O., Okere, U. A., Odofin, W. T. The potential of temporary immersion bioreactors (TIBs) in meeting crop production demand in Nigeria. *J. Biol. Life Sci.* 2012, 3, 66-86.
- Navarro, G. E. Z., Honorato, A. E. S., Oyarzun, A. G. C., Rodriguez, E. A. T., et al. Thermo-photo-bioreactor and method for the culture and mass micropropagation of *Deschampsia antarctica in vitro*. US Patents 2011, US20130344528 A1.
- Scheidt, G. N., Silva, A., Oliveira, Y., Costa, J. et al., In vitro growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles. *Pak. J. Bot.* 2011, 43, 2937–2939.
- Uchendu, E., Paliyath, G., Brown, D. W., Saxena, P. *In vitro* propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 2011, 47, 710-718.
- Watt, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *Afr. J. Biotechnol.* 2012, 11, 14025-14035.
- Yan, H., Liang, C., Li, Y. Improved growth and quality of *Siraitia grosvenorii* plantlets using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2010, 103, 131-135.
- Yang, L., Zambrano, Y., Hu, C.-J., Carmona, E. et al., Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 2010, 46, 558–568.
- Robert M.L., Herrera-Herrera J.L., Herrera-Herrera G., Herrera-Alamillo M.Á., Fuentes-Carrillo P. (2006) A New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation. In: Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 318. Humana Press.
- Businge, E., Trifonova, A., Schneider, C., Rödel, P., & Egertsdotter, U. (2017). Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of eucalyptus, birch and fir. *Forests*, 8(6), 196.

49
48

BR212016010698

WO9625484A1

WO2012146872

REVENDICĂRI

Un bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropropagării plantelor **caracterizat prin aceea că** este format din două componente principale: unitatea de bază (UB) sau vasul de cultură al bioreactorului (Fig. 2a) și unitatea de control și de decizie (UCD) (Fig. 2b). Unitatea de bază a bioreactorului (UB) sau componenta sterilă (Fig.3a) este formată din vasul bioreactorului (1) confecționat dintr-un material transparent autoclavabil (policarbonat, polipropilenă), sita pentru inocularea explantelor (2), capacul (3), tubul de absorbție a mediului de cultură (4) prevăzut cu sorb (5), duza de pulverizare a mediului de cultură (6) și baza pompei peristaltice (7). Unitatea de control și decizie (UCD) sau componenta nesterilă (Fig. 3b) este amplasată pe capacul unității de bază (UB) și este un sistem compact format din: carcasa UCD (9) cu cleme de fixare (10) pe UB, capul presor (11) al pompei peristaltice, axul motorului (12), motorul pas cu pas (13), capac superior cu fante (14) pentru unitatea de comandă (15) (formată din placa de dezvoltare Arduino Uno, modulul 1602 LCD keypad Shield, driver pentru motor) și sursa de alimentare cu 12 Vcc (16).

Bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată conform revendicării 1 destinat înrădăcinării lăstarilor obținuți în etapa de multiplicare in vitro **caracterizat prin aceea că** sita (2) va fi înlocuită cu tava alveolară (8).

Bioreactor cu unitate de decizie și control digitalizată destinat micropropagării plantelor conform revendicării 1 sau 2 **caracterizat prin aceea că** pulverizarea mediului de cultură se face direct prin tubul din silicon (4).

Unitate de comandă pentru bioreactor **caracterizată prin aceea că** este formată din sursă de 12 V cc, 2 A (16), condensator electrolitic 220 μ F/16V (25), placă de dezvoltare Arduino uno (14), 1602 LCD Keypad Shield (23), driverul (24) pentru motorul pas cu pas (13) și schema logica după care se scrie codul sursă.

Desene explicative

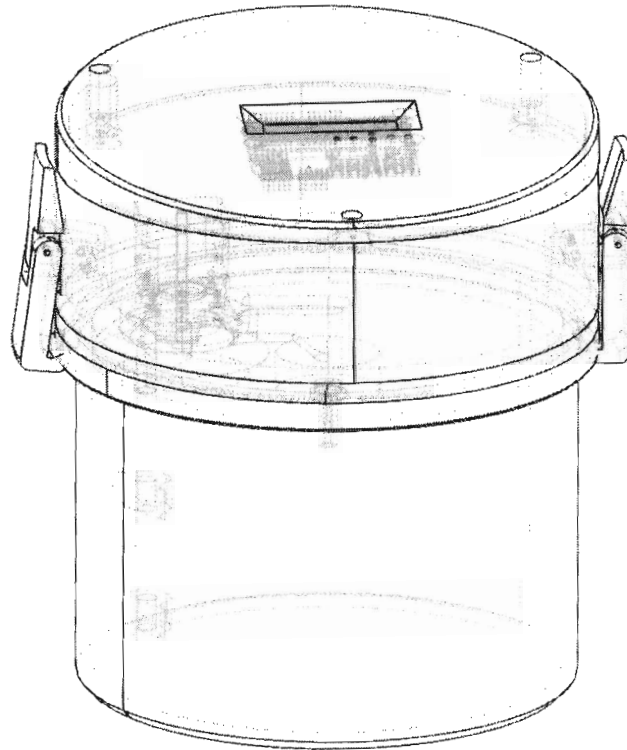


Figura 1.

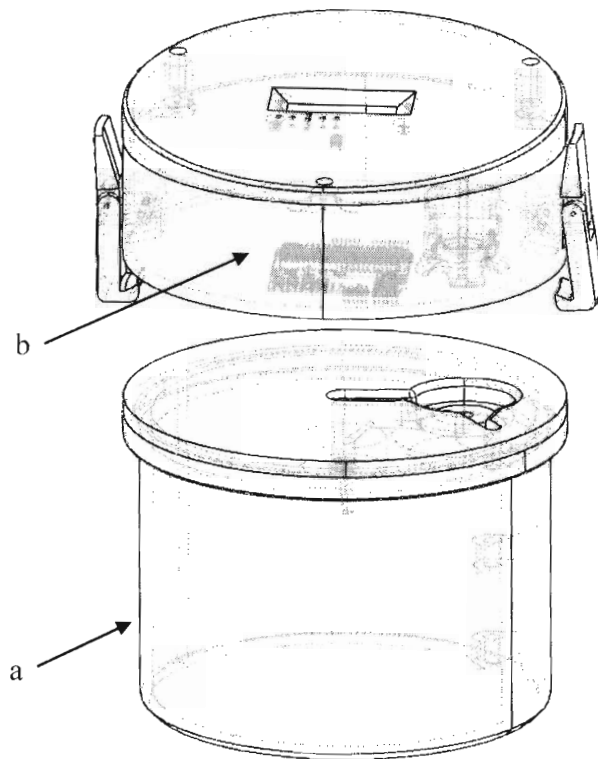
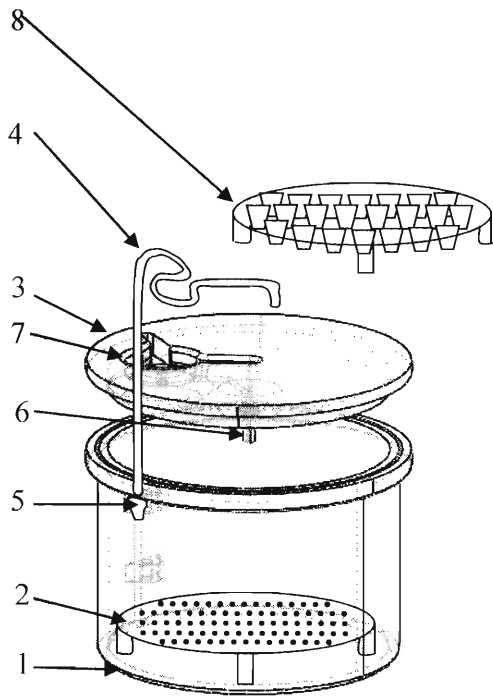
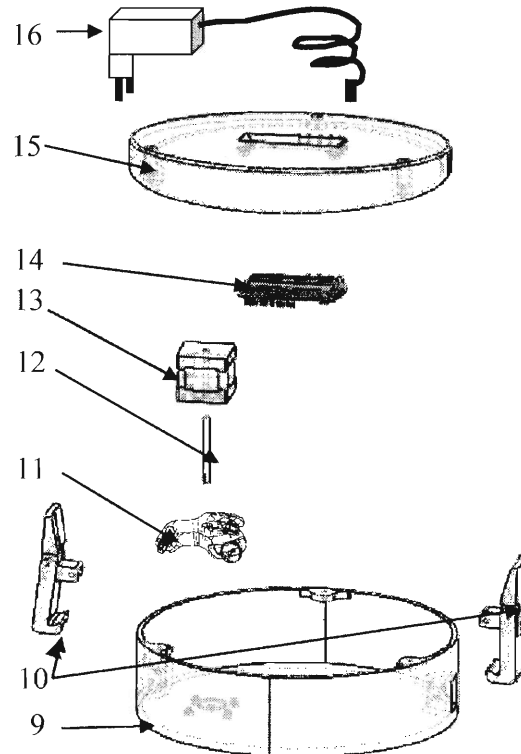


Figura 2.



a



b

Figura 3

17

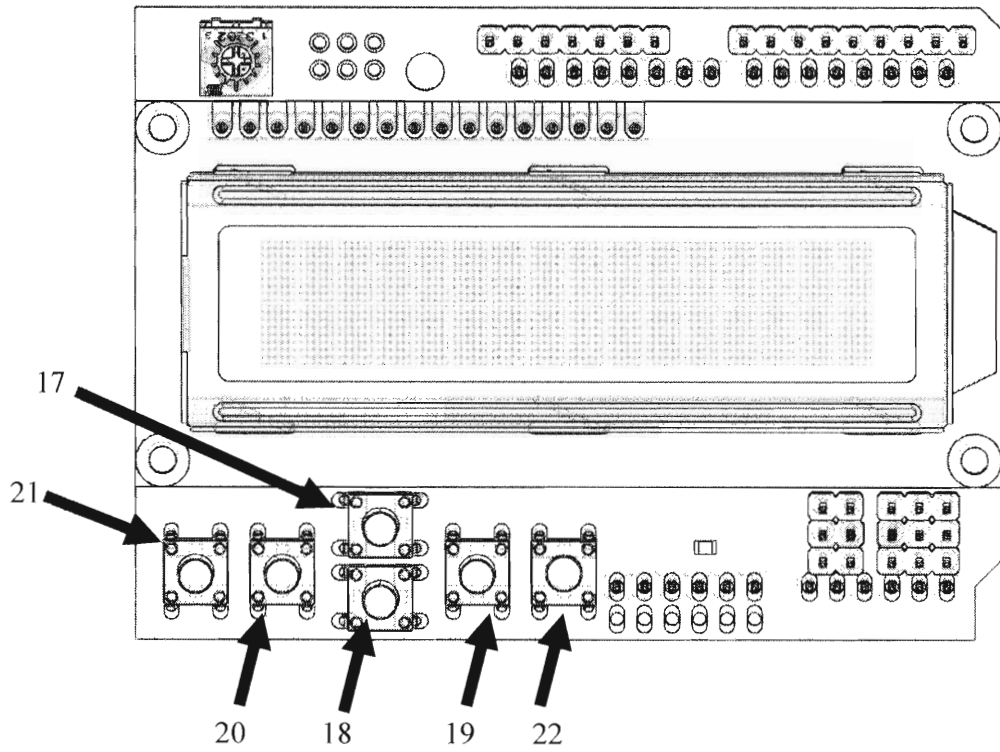


Figura 4

43

18

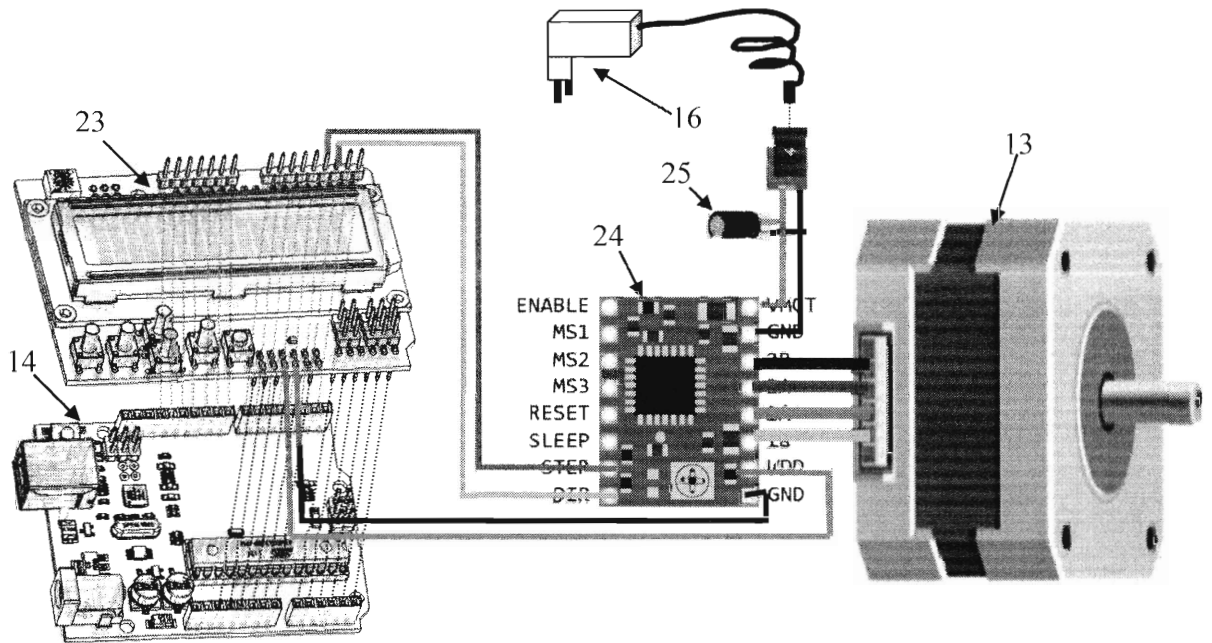


Figura 5.

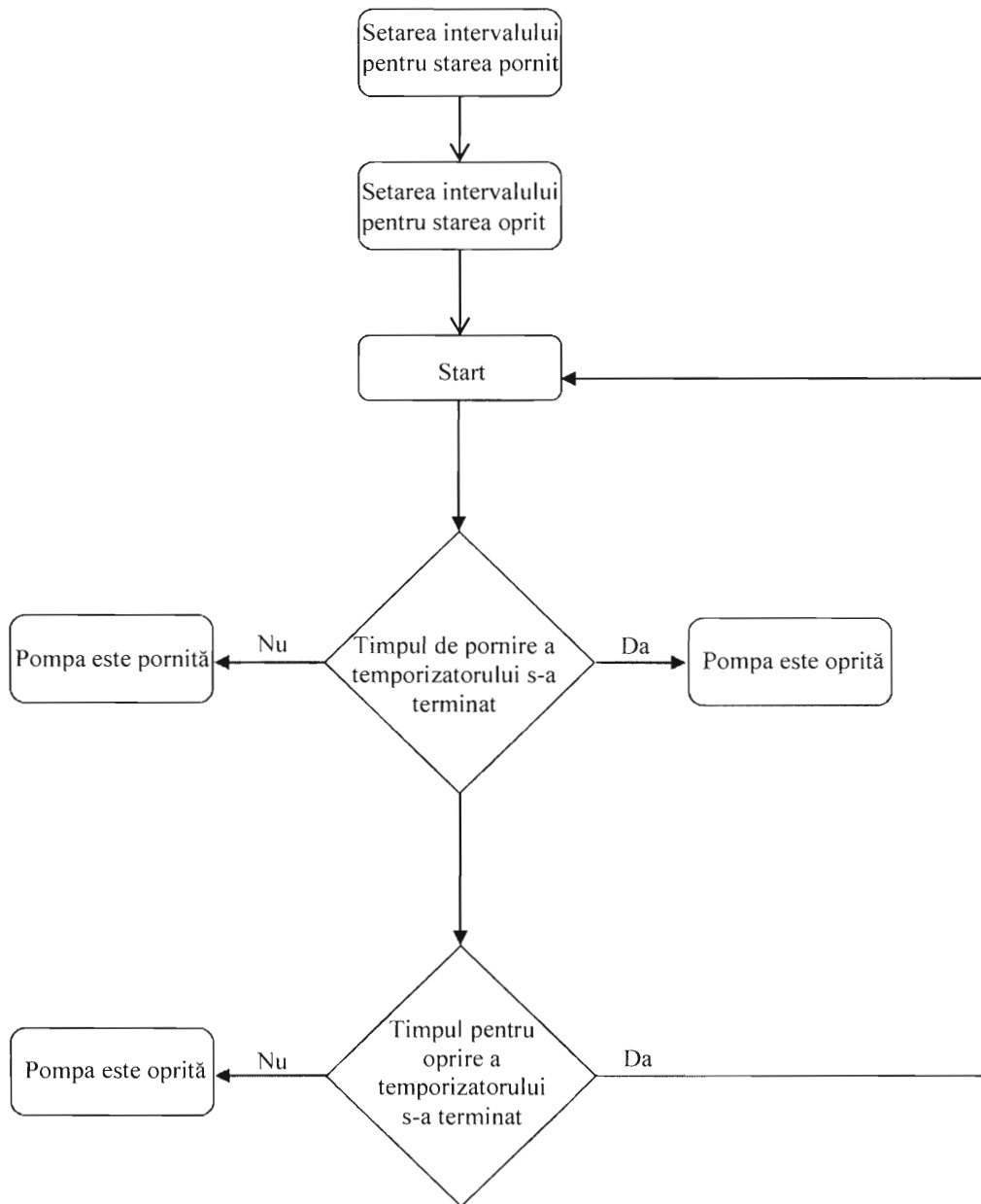


Figura 6.