



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00935**

(22) Data de depozit: **02/12/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2019** BOPI nr. **10/2019**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2016** BOPI nr. **6/2016**

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

(72) Inventatori:  
• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **RĂUT IULIANA,  
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,  
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **SESAN TATIANA EUGENIA,  
BD. IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,  
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU  
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **POPESCU MARIANA, STR. VALEA ROȘIE  
NR. 6, BL. 62, SC. C, ET. 1, AP. 35,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **JECU MARIA- LUIZA,  
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 127470 A2; "POLIMERI IMPRIMAȚI  
MOLECULAR PENTRU SEPARAREA  
SELECTIVĂ A COMPUȘILOR BIOACTIVI -  
SINTEZĂ, CARACTERIZARE, TRANSFER DE  
MASĂ ȘI MODELARE MATEMATICĂ" -  
[https://www.researchgate.net/profile/Stefan\\_  
Ovidiu\\_Dima/publication/312176080](https://www.researchgate.net/profile/Stefan_Ovidiu_Dima/publication/312176080);  
**RO 127196 B1****

(54) **METODĂ DE SELECȚIE A CONSORȚIILOR  
DE MICROORGANISME DESTINATE TRATAMENTULUI  
MATERIALULUI VEGETAL**



# RO 131224 B1

1 Prezenta invenție se referă la o metodă de selecție a consorțiilor de microorganisme  
2 destinate tratamentului materialului vegetal în scopul: (i) degradării lignocelulozei în  
3 componente mai simple, care pot fi procesate ulterior prin biorafinare în bio-combustibili,  
4 biosolvenți, biopolimeri sintetici, biostimulanți pentru plante; (ii) managementului durabil al  
5 resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; (iii) inoculării nutrețurilor  
6 însilozate în vederea fermentării controlate pentru creșterea valorii nutritive.

7 În cererea de brevet **RO 127470 A2**, este descrisă o metodă de selecție a izolatelor  
8 de microorganisme antagoniste fitopatogenilor, destinată identificării rapide a tulpinilor  
9 microbiene utilizabile ca ingrediente active în bio-produse pentru protecția plantelor. Metoda  
10 implică monitorizarea a doi parametri fiziologici, corelabili, determinați prin metode diferite,  
11 ale culturilor de microorganisme și de țesuturi vegetale, expuse reciproc la compușii care  
12 difuzează în mediu. Acest procedeu nu permite însă identificarea rapidă a consorțiilor  
13 compatibile care secretă exo-proteine cu efect sinergic/complementar în degradarea  
14 materialului vegetal.

15 Documentul "**Polimeri imprimați molecular pentru separarea selectivă a**  
16 **compușilor bioactivi- sinteză, caracterizare, transfer de masă și modelare matematică**"  
17 **-[https://www.researchgate.net/profile/stefan\\_ovidiu\\_dima/publication/312176080\\_](https://www.researchgate.net/profile/stefan_ovidiu_dima/publication/312176080_molecularly_imprinted_polymers_for_selective_separation_of_bioactives_compounds_-_synthesis_characterisation_mass_transfer_and_mathematical_modelling/links/5874ced908ae6eb871c9726a/molecularly-imprinted-polymers-for-selective-separation-of-bioactives-compounds-synthesis-characterisation-mass-transfer-and-mathematical-modelling.pdf)**  
18 **molecularly\_imprinted\_polymers\_for\_selective\_separation\_of\_bioactives\_compounds\_**  
19 **-\_synthesis\_characterisation\_mass\_transfer\_and\_mathematical\_modelling/links/5874**  
20 **ced908ae6eb871c9726a/molecularly-imprinted-polymers-for-selective-separation-of-**  
21 **bioactives-compounds-synthesis-characterisation-mass-transfer-and-mathematical-**  
22 **modelling.pdf** oferă informații cu privire la sintetizarea și studiul unui tip special de materiale  
23 selective numite polimeri imprimați molecular (MIP), folosind instrumentele ingineriei chimice  
24 și tehnici analitice moderne. Principiul imprimării moleculare se bazează pe inducerea unor  
25 conformații moleculare unei matrici polimerice, procedeu inspirat de natură și cunoscut sub  
26 numele de biomimetică. Prin procedura de imprimare moleculară, polimerii MIP pot fi  
27 programați să recunoască, cu o afinitate și selectivitate extrem de ridicate, similare cu ale  
28 anticorpilor, o largă varietate de molecule țintă.

29 **RO 127196 B1** descrie un procedeu de tratare a unei biomase lignocelulozice, utilizat  
30 în procesul de obținere a unui combustibil bioetanol. În acest document, se precizează  
31 necesitatea pretratării biomasei lignocelulozice, în vederea creșterii randamentului în  
32 monozaharidele fermentabile din structura celulozei și hemicelulozei, și, implicit, de creștere  
33 a vitezei de hidroliză, etapă ce poate fi realizată prin metode chimice, fizice (expandarea cu  
34 amoniac) sau biologice.

35 Sunt cunoscute diferite procedee pentru screeningul de înalt randament al  
36 tulpinilor/izolatelor de microorganisme care produc enzime/complex proteice cu rol în degra-  
37 darea componentelor materialului vegetal. Cererea de brevet **WO 2013135245 A1** descrie  
38 un procedeu de screening de înalt randament pentru glicozil-hidrolaze (celulaze, pectinaze,  
39 hemicelulaze). În acest procedeu, se amestecă o probă (candidat), conținând enzime cu  
40 activitate glicozil-hidrolazică, cu un substrat complex de material vegetal, se incubează  
41 amestecul pentru ca enzimele și polizaharidele/carbohidrații din materialul vegetal să inter-  
42 acționeze, și apoi se compară compoziția de carbohidrați rezultată cu cea inițial existentă în  
43 substrat. Probele pot fi reprezentate de microorganisme izolate din mediu, nemodificate  
44 genetic, din microorganisme supuse diferitelor tipuri de mutageneză, controlată sau necon-  
45 trolată, sau din microorganisme modificate genetic. Aceste probe pot fi suplimentate cu inhi-  
46 bitori sau potențiatori cunoscuți ai activității glicozil-transferazelor - module de legare a car-  
47 bohidraților (carbohydrate binding modules, CBMs), expansine sau „amplificatori de celulază”  
(„*cellulose enhancers*”), inclusiv familia 61 de proteine produsă de *Trichoderma reesei*.

# RO 131224 B1

Determinarea compoziției în zaharide, în substratul complex de material vegetal și în produșii reacției de hidroliză a acestui substrat de către glicozil-hidrolaze, se realizează cu ajutorul unor liganzi cu specificitate de carbohidrat - anticorpi monoclonali, module de legare a carbohidraților, lectine. Evidențierea legării acestor liganzi de structurile zaharidice pentru care au specificitate se face prin utilizarea unui al doilea set de liganzi, cu specificitate de legare pentru ligandul carbohidrat specific (de exemplu anticorpi monoclonali anti-liganzi cu specificitate de carbohidrat). Setul de liganzi cu specificitate de legare este, eventual, marcat.

Procedeu se poate realiza, de exemplu, și prin utilizarea unor plăci de microtitrare standardizate, cu 96, 384 sau 1536 godeuri, dar cererea de brevet **WO 2013135245 A1** revendică și utilizarea unei tehnologii de contact liber, respectiv tehnologia de printare piezo-electrică cu jet de cerneală. Prin această tehnologie se realizează o micro-etalară a unor spoturi în care sunt distribuite probele de analizat (biblioteci de enzime microbiene sau proteine recombinante, purificate prin cromatografie de afinitate), soluțiile/suspensiile de substrat complex de material vegetal, eventual inhibitorii sau potențiatorii activității enzimice, liganzii cu specificitate de carbohidrat, și liganzii secundari, specifici liganzilor inițiali.

Cererea de brevet **CN 102212608** se referă la un procedeu de screening de înalt randament, care utilizează plăci de 96 godeuri. În fiecare dintre godeuri se determină activitatea celulazică din diferite supernatante (inclusiv mediile de cultură ale unor izolate de microorganisme), folosind ca substrat o suspensie fină de material vegetal supus pre-tratamentului de expandare cu abur și reactiv 2,5 dinitrosalicilic (DNS) pentru evidențierea grupărilor zaharidice reducătoare eliberate prin hidroliza substratului sub acțiunea celulazelor testate.

Cererea de brevet **EP 1230348 A1** prezintă un procedeu de înalt randament pentru screeningul populațiilor celulare care produc diferite tipuri de molecule de interes. Procedeu include: aranjarea populațiilor de interes într-un aranjament spațial de tip micro-matrice (micro-array), astfel încât fiecare poziție să fie ocupată de un singur tip de populație (rezultată din multiplicarea unei celule inițiale singularizate); cultivarea populațiilor celulare, determinarea prezenței moleculelor de interes în fiecare poziție, urmată de selectarea populațiilor care produc moleculele de interes. Aranjamentul spațial de tip micro-matrice se exemplifică prin realizare într-o placă de microtitrare, pe o suprafață solidă, de exemplu sticlă, sau pe un suport textil (nitroceluloză). Probele din fiecare poziție se transferă pe o poziție echivalentă dintr-un aranjament secundar, ocupată de o granulă, de preferat de agaroză, care include populațiile de celule testate. Procedeu este revendicat și pentru screeningul producerii de glicozil-hidrolaze (celulaze, hemicelulaze, enzime pectinolitice).

Una din problemele tehnice în identificarea rapidă a izolatelor de microorganisme care produc amestecuri de enzime cu activitate de degradare a materialului lignocelulozic, glicozil-hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor și oxidaze care acționează asupra lignocelulozei, este determinată de faptul că astfel de amestecuri de enzime degradează uneori și polizaharidele folosite uzual ca agenți de gelifiere a mediilor de cultură - agarul, agaroză, gellanul, xanthanul. Gardner et al. (2012) (Biotechnol. Lett., 34: 81-89) au dezvoltat un procedeu de screening în care folosesc un mediu solidificat cu poli(acrilamidă) (în locul agenților uzuali de gelifiere), cu omogenat de tulpini de porumb pretratate prin expandarea fibrelor cu amoniac (AFEX), ca unică sursă de carbon și energie. Unele din microorganismele din sol au însă capacitatea ridicată de a degrada și poli(acrilamidă), cu utilizarea ei atât ca sursă de carbon și energie, cât și ca sursă de azot (Weng et al. 2010, J. Hazard. Mat. 175: 327-330; Matsuoka et al. 2002, Biotechnol. Bioprocess. Eng. 7: 327-330, Nakayamiya și Kinoshita, 1995, J. Ferm. Bioeng. 80: 418-420), deci poli(acrilamidă) nu este cel mai convenabil agent de gelifiere al mediilor utilizate pentru screening izolatelor de microorganisme cu capacitate ridicată de degradare a materialului lignocelulozic.

# RO 131224 B1

1 Nu s-au descris până acum procedee de înalt randament prin care să se selecteze  
2 consorții de microorganisme care produc enzime și/sau complexe proteice non-catalitice cu  
3 acțiune sinergică/complementară în degradarea materialului vegetal.

4 Cererea de brevet **WO 2004083409 A1** revendică inclusiv procedeul prin care a fost  
5 selectat consorțiul format din tulpinile de microorganisme CBTCC/5203, CBTCC/5303 și  
6 CBTCC5403, depozitate la IMTECH, Chandigarh, India, cu numerele de acces MTCC 5094,  
7 MTCC 5095 și MTCC 5098, care au capacitate de degradare a ligninei. Procedeul constă  
8 în următoarele etape: a) îmbogățirea florei bacteriene din arealul folosit pentru prelevare;  
9 b) izolarea bacteriilor ligninolitice folosind diferite medii; c) cultivarea bacteriilor izolate în  
10 diferite condiții de mediu, temperatură, pH-ul, sursa de carbon etc.; d) verificarea capacității  
11 izolatelor de degradare a ligninei prin inocularea izolatelor bacteriene în 10 ml de lignină  
12 0,4%; e) selectarea izolatelor bacteriene care decolorează lignina în mod eficient;  
13 f) adaptarea celor care sunt eficiente la cultivarea pe lignină g) cultivarea tulpinilor bacteriene  
14 în amestec pentru a se vedea interacțiunile/efectul lor sinergic în degradarea ligninei;  
15 h) selectarea consorțiului microbial care cuprinde cele trei izolate bacteriene. Un astfel de  
16 procedeu nu este de înalt randament, pentru că este prea laborios și nu se poate aplica  
17 într-un timp scurt, pe matrici de izolate/tulpini de testat.

18 Consorțiile de microorganisme care degradează lignoceluloza includ tulpini care  
19 produc diferite tipuri de enzime și/sau potențiatori ai acestora. Un procedeu de screening de  
20 înalt randament ar trebui să permită identificarea rapidă a interacțiunilor acestor proteine  
21 secretate de microorganisme în degradarea lignocelulozei. Întrucât competiția domină în  
22 consorțiile microbiene implicate în degradarea materialului vegetal lignocelulozic (**Foster și**  
23 **Bell, 2012, Curr. Biol. 22: 1845-1850**), procedeul de screening ar trebui să asigure și  
24 identificarea rapidă a tulpinilor de microorganisme compatibile, inclusiv a celor care se  
25 stimulează reciproc în dezvoltare.

26 Consorțiile microbiene destinate managementului durabil al resturilor vegetale în  
27 sistemele de agricultură conservativă ar trebui să prezinte caracteristici de antagonism  
28 pentru agenții fitopatogeni și de stimulare a plantelor de cultură, de exemplu prin producerea  
29 de fitohormoni. Acoperirea permanentă a solului este un principiu important al sistemelor de  
30 agricultură conservativă (CA) (a se vedea de exemplu: site-ul FAO CA:  
31 <http://www.fao.org/aq/ca/1a.html>). Resturile vegetale care acoperă solul limitează evaporarea  
32 și facilitează infiltrarea apei, reduc eroziune, ameliorează structura solului, cresc conținutul  
33 de materie organică și de carbon, și moderează temperatura solului în zonele calde (**Fabrizzi**  
34 **et al. 2005, Soil Till. Res. 81: 57-69**). În pofida numeroaselor avantaje, sunt și o serie de  
35 efecte negative asociate cu sistemele cu resturi vegetale. Resturile de plante favorizează  
36 dezvoltarea agenților fitopatogeni din sol (**Bockus și Shroyer 1998, Ann. Rev. Phytopath.**  
37 **36: 485-500**), inclusiv a celor devastanți, cum sunt, de exemplu, cei care produc fuzarioza  
38 spicului de grâu (**Leplat et al. 2013, Agron. Sust. Develop., 33: 97-111**). Pentru că reduc  
39 temperatura solului, resturile vegetale determină și întârzieri ale primelor fenofaze din ciclul  
40 de dezvoltare specific culturilor înființate în astfel de sisteme CA (**Page et al. 2013, Austr.**  
41 **Plant Path., 42: 363-377**). Consorții de microorganisme, cu activitate antagonică și de  
42 stimulare a dezvoltării plantelor, aplicate pe resturile vegetale care acoperă solul, ar  
43 compensa aceste efecte secundare negative ale sistemelor CA.

44 Cererea de brevet **US 20120107915** se referă la un procedeu de screening rapid al  
45 tulpinilor de microorganisme antagoniste față de agenții fitopatogeni, care implică utilizarea  
46 unor platforme multitest. Platformele multitest includ între 12 și 1500 de izolate, etalate pe  
47 un mediu de cultură într-o micro-matrice în care sunt distribuite și microorganismele

# RO 131224 B1

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| fitopatogene. Izolatele de microorganisme testate sunt sortate prin citometrie în flux, înainte de a fi co-cultivate cu agenții fitopatogeni. Procedul nu asigură însă selecția tulpinilor de microorganisme cu activitate de stimulare a dezvoltării plantelor de cultură și nu permite identificarea consorțiilor compatibile care secretă exo-proteine cu efect sinergic/complementar în degradarea materialului vegetal.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1<br>3<br>5          |
| Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este identificarea rapidă a consorțiilor de microorganisme mutualiste care degradează materialul vegetal, a celor care prezintă antagonism față de microorganismele fitopatogene și a celor care fermentează controlat nutrețurile însilozate, din perspectiva existenței unei competiții acerbe între aceste consorții de microorganisme.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 7<br>9               |
| Noțiunea de „consorții de microorganisme mutualiste” se referă la comunitățile de microorganisme, procariote (bacterii, gram-negative sau gram-pozitive, cianobacterii) și/sau arhee (de exemplu: microorganisme extremofile) și/sau eucariote (drojdii/levuri, fungi, alge), în care interacțiunile biologice sunt reciproc benefice.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 11<br>13             |
| „Amestecurile de enzime cu activitate de degradare a lignocelulozei” includ glicozil-hidrolaze (celulaze, hemicelulaze, enzime care degradează pectina), oxido-reductaze care desfac macromolecula de lignină în compuși fenolici mai simplu de asimilat de microorganisme, esteraze care eliberează acizii cinamici esterificați cu porțiunile terminale ale hemicelulozelor (porțiuni esterificate care stabilesc interacțiuni de tip pi cu lignina, între porțiunea fenolică a acizilor cinamici și resturile fenolice ale ligninei).                                                                                                                                                                                                           | 15<br>17<br>19       |
| „Potențiatorii enzimelor cu activitate de degradare a lignocelulozei” se referă la proteine cu activitate non-catalitică care slăbesc structurile de ordin superior ale fibrilelor de celuloză prin desfacerea legăturilor de hidrogen (cum sunt, de exemplu: cerato-plataninele, recent trecute în revistă de <b>Gader et al. 2014, Appl. Microbiol. Biotechnol. 98: 4795-4803</b> ), ca și la compușii care leagă inhibitorii enzimelor cu activitate de degradare a lignocelulozei, inhibitori care apar în procesele de pre-tratament sau de degradare a materialului lignocelulozic.                                                                                                                                                          | 21<br>23<br>25<br>27 |
| Este un alt scop al acestei invenții de a prezenta o variantă prin care metoda conform invenției să fie utilizată pentru identificarea rapidă a consorțiilor de microorganisme mutualiste care degradează materialul vegetal, cu producerea de compuși care au o acțiune biostimulantă asupra plantelor cultivate.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 29<br>31             |
| "Acțiunea biostimulantă asupra plantelor cultivate" implică creșterea: (i) vigoriei culturii; (ii) nivelului producției și/sau a calității acesteia; și (iii) toleranței la stresurile biotice și abiotice.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 33                   |
| Exemple de „compuși care au o acțiune biostimulantă asupra plantelor cultivate” eliberați din materialul vegetal, și care au fost considerați în această invenție, sunt poliaminele și fragmentele de material lignocelulozic care acționează ca elicitori ai sistemului de apărare din plante și regulatori ai creșterii și dezvoltării plantelor (oligozaharine).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 35<br>37             |
| „Poliaminele” sunt metaboliți cu două sau mai multe grupări amino (cadaverină, putresceină, spermină, spermidină) care au rol de endo- și exo-semnale în sistemele biologice.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 39<br>41             |
| „Elicitorii” sunt exo-semnale percepute de receptorii celulelor vegetale care declanșează răspunsul de apărare din plante. O categorie de elicitori sunt cei care au un tipar molecular similar deteriorărilor rezultate la nivelul peretelui celular vegetal ca urmare a atacului agenților fitopatogeni, și care semnalează pericolul prezenței acestora ( <b>DAMPs - danger-associated molecular patterns</b> - a se vedea, de exemplu: review-ul <b>Boiler și Felix, 2009, Annu. Rev. Plant Biol. 60: 379-406</b> ). Diferite tipuri de oligozaharide eliberate ca fragmentele din materialul lignocelulozic supus acțiunii de degradare a microorganismelor/complexelor enzimactice produse de acestea au o similitudine pronunțată cu DAMPs. | 43<br>45<br>47<br>49 |

# RO 131224 B1

1 „Oligozaharinele” sunt compuși rezultați prin degradarea peretelui celular  
vegetal/materialului lignocelulozic, în special oligalacturonide formate prin hidroliza pectinei,  
3 care au rol nu numai în activarea sistemelor de apărare din țesuturile vegetale, ci și în  
reglarea creșterii și dezvoltării plantelor (acționează ca biostimulanți pentru plante - a se  
5 vedea, de exemplu: review-ul **Cabrera et al., 2013, ActaHort., 1009, 195-212**).

Un alt scop al acestei invenții este de a prezenta o variantă prin care metoda conform  
7 invenției să fie utilizată pentru identificarea rapidă a consorțiilor de microorganisme  
mutualiste care prezintă antagonism față de microorganismele fitopatogene care includ în  
9 ciclul lor de dezvoltare o etapă de dezvoltare pe resturile vegetale.

„Microorganismele fitopatogene care includ în ciclul lor de dezvoltare o etapă de  
11 dezvoltare pe resturile vegetale” considerate în această invenție sunt microorganisme  
cultivabile, cu un mod de nutriție hemibiotrof (de exemplu: *Septoria tritici* sau *Phytophthora*  
13 *sojæe*) sau necrotrof (*Stagonospora nodorum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*,  
*Pyrenophora tritici-repentis*, *Fusarium graminearum*) și ciclul epidemiologic care include  
15 preponderent numai inocul primar format de populațiile care ierneză pe resturile vegetale  
(ca de exemplu: *Fusarium graminearum*) sau în care inoculul primar co-există cu inoculul  
17 secundar format prin dezvoltarea agenților fitopatogeni în leziunile produse în plantele gazdă  
(de exemplu: *Pyrenophora tritici-repentis*, *Macrophomina phaseolina*, *Stagonospora*  
19 *nodorum*) sau în care inoculul secundar urmează inoculului primar (de exemplu: *Phytophthora*  
*spp.*).

21 Este un alt scop al acestei invenții de a prezenta o variantă prin care metoda conform  
invenției să fie utilizată pentru identificarea rapidă a consorțiilor de microorganisme  
23 mutualiste care fermentează controlat nutrețurile însilozate, pentru creșterea valorii nutritive,  
în special datorită producerii de acizi grași cu catenă scurtă.

25 „Acizii grași cu catenă scurtă” (SCFAs, Short-chain fattyacids) includ acizii formic,  
acetic, propionic, izo-butiric (acid 2-metilpropanoic), butiric, izo-valerianic (acid 3-metil-  
27 butiric) și valerianic (acid pentanoic), care au efecte benefice asupra sănătății animalelor  
de fermă, inclusiv datorită efectului post-biotoc (pentru efectul post-biotoc, a se vedea, de  
29 exemplu, review-ul **Brüssov și Parkinson, 2014, Nature Biotechnology, 32: 243-245**).

Metoda conform invenției este alcătuită din următoarele etape:

31 - depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu a unui film  
detector, cu o grosime de 2 mm, care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic, cu  
33 răspuns specific la componentele de interes, eliberate din materialul lignocelulozic sub  
acțiunea izolatelor/tulpinilor testate;

35 - adăugarea aseptică peste filmul detector a unui mediu minimal sterilizat, cu o  
grosime de 6 mm, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat, ca unică sursă de  
37 carbon și energie, și care este hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc  
central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol;

39 - inocularea în condiții axenice a mediului minimal hidrogelifiat, cu 12 tulpini/izolate  
de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu  
41 96 pini din oțel inox, a 10...20  $\mu$ l de inocul lichid, cu circa  $10^6$  ufc/ml, dintr-o placă cu 96 de  
godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea  
43 tulpinilor/izolatelor de testat;

- incubarea timp de 60...120 h a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii gelului  
45 detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltare în partea  
de sus, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 12 în 12 h;

# RO 131224 B1

- realizarea unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele/tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat, prin inocularea în condiții axenice, a celor 12 tulpini/izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri, cu partea interioară deschisă, așezată peste film detector, cu o grosime de 1...2 mm, care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic, cu răspuns specific la componentele de interes, și care conține în fiecare godeu aceeași grosime de mediul minimal hidrogelificat, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat ca unică sursă de carbon; 1
- incubarea timp de 60...120 h a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii gelului detector din partea de jos și a coloniilor de microorganisme dezvoltare în partea de sus, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginilor, din 12 în 12 h; 3
- analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor softuri specializate, compararea rezultatelor din proba cu 12 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacțiune reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină/izolat de testat s-a dezvoltat separat, iar identificarea microorganismelor interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, respectiv în producerea compușilor de interes din materialul lignocelulozic, evidențiați specific de gelul detector. 5
- Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt: 7
- filmul care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic detector se obține prin preluarea cu un film adeziv, de pe o suprafață de sticlă, a unei matrici coloidale impregnate molecular, formată pe respectiva suprafață prin cristalizarea unei suspensii de sfere coloidale impregnate molecular, preparată prin polimerizare în emulsie fără agent emulsifiant; 9
- moleculele folosite pentru impregnarea moleculară a sferelor coloidale impregnate molecular sunt: celobioza,  $\beta$ -5/ $\alpha$ -O-4 fenilcoumaranul sau acidul *p*-coumaric, atunci când se urmărește detectarea consorțiilor de microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; putresceina sau oligolacturonide cu 10 resturi de galacturonosil legate  $\alpha$ -1,4, pentru identificarea consorțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; acidul butiric și acidul propionic, în cazul selecției consorțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor în silozate; 11
- materialul lignocelulozic micronizat folosit ca sursă unică de carbon și energie în mediul minimal este reprezentat de pulbere micronizată de: tulpini de porumb, *Zea mays*, pretratate prin expandarea fibrelor cu amoniac în cazul selecției consorțiilor microorganismelor mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; tulpini de măzăriche de toamnă, *Vicia villosa*, pentru identificarea consorțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; amestec de părți aeriene verzi ale unei graminee perene, *Festuca pratensis*, și ale unei leguminoase perene *Trifolium repens*, în proporții egale, în cazul selecției consorțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor în silozate; 13
- incubarea se face la temperatura de 30°C și în condiții de aerobioză, în cazul selecției consorțiilor microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; la 24°C și în condiții de aerobioză, pentru identificarea consorțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; la 35°C și în condiții de anaerobioză, în cazul selecției consorțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor în silozate. 15

# RO 131224 B1

1 Inventția prezintă următoarele avantaje:

3 - realizarea concomitentă a screeningului pentru mai multe caracteristici ale unor  
izolate/tulpini, respectiv capacitatea de a crește pe material lignocelulozic ca singură sursă  
de carbon și energie, producerea diferiților compuși prin degradarea materialului  
5 lignocelulozic, interacțiunea biologică cu alte tulpini/izolate, respectiv antagonism, neutralism,  
mutualism;

7 - asigurarea statistică a experimentelor datorită utilizării unor scheme de testare  
randomizată, compatibile cu modelele de analiză a variantei;

9 - posibilitatea evidențierii interacțiunilor dintre microorganismele care se dezvoltă în  
structuri de tip biofilm, similare celor naturale, datorită mediului hidrogelificat cu un tribloc co-  
11 polimer; în structurile de tip biofilm microorganismele prezintă rezistență sporită la factorii de  
mediu, inclusiv antagonism.

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

## Exemplul 1

15 Se prepară sferele coloidale monodisperse impregnate molecular, utilizate pentru  
filmul detector, prin polimerizare în emulsie, fără emulgator. Într-un balon cu fund plat de  
17 1000 ml cu 4 găuri, prevăzut cu un condensator de reflux, ax de amestecare teflonat  
antrenat de un agitator mecanic, termorezistență pentru măsurarea temperaturii și o intrare  
19 de azot, se aduc 20 ml apă pură, dublă distilată. În apă se adaugă 25 ml metil-metacrilat,  
0,24 g acrilamidă și 0,39 celobioză ( $\beta$ -D-Glc-(1-4)-D-Glc, 4-O- $\beta$ -D-Glucopiranosil-D-glucoză,  
21 Reactivi de la Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA). Soluția se dezoxigenează prin barbotare  
de azot pentru 30 min, la o agitare de 300 rpm. După dezoxigenare la același nivel de  
23 agitare, se crește temperatura la  $80 \pm 1^\circ\text{C}$ , și se injectează 15 ml de soluție care conține  
0,6 g de peroxidisulfat de potasiu (Merck, Darmstadt, Germania). Reacția se menține la  
25 refluxare pentru 45 min. După polimerizare, sferele coloidale impregnate molecular se separă  
de emulsia rezultată prin centrifugare la 500 x g pentru 10 min. Pentru a înlătura moleculele  
27 matriță folosite pentru impregnarea moleculară, sferele coloidale au fost spălate repetat, cu  
soluții de acid acetic - metanol - apă (1:4:4), soluție apoasă de metanol 50% (v/v) și apă  
29 dublu distilată sterilă. Sferele coloidale impregnate molecular au fost dispersate aseptice în  
apă dublu distilată sterilă, la o concentrație de 0,3% (m/v), și apoi trecute aseptice într-o placă  
31 Petri Ø140 mm sterilă. În suspensia de sfere coloidale se introduc plăcuțe de sticlă de  
microtitrare (Microplates SuperClean, Arrayit, Sunnyvale, CA, SUA) pe care se formează,  
33 în timp de 24 h, cristale de sfere coloidale impregnate molecular. Cristalele de sfere coloidale  
impregnate molecular se preiau cu un film adeziv în condiții aseptice (Seal-It 100™ Automated  
35 Adhesive Sealer, Thermo Fisher Scientific). Filmul adeziv se transferă aseptice pe o placă  
sterilă de micro-titrare cu un singur godeu, și formează stratul detector, cu o grosime de  
37 2 mm, cu răspuns specific, evidențiable printr-o reacție de culoare la prezența celobiozei. În  
prezența moleculei cu care au fost impregnate molecular (în acest caz celobioza), rețeaua  
39 tridimensională a hidrogelului se strânge, cu modificarea lungimii de undă la care lumina  
suferă un fenomen de difracție în rețeaua nano-structurată de cristal fonic polimeric.  
41 Această modificare a lungimii de undă de difracție este percepută ca o modificare a culorii  
matricei de cristal fonic.

43 Se prepară un mediu minimal M9 care conține la 1 l:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidru) 6 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
3 g;  $\text{NaCl}$  0,5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g, 10 g pulbere micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pre-  
45 tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac, și nouă microelemente, în următoarele concen-  
trații 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;  
47  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$   $3 \times 10^{-8}$  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 (Reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). Se  
49 realizează mai întâi mediul cu principalele săruri și pulberea micronizată de tulpini de  
porumb, se aduce pH la 7,4 cu NaOH.



# RO 131224 B1

Mediul se hidrogelifiează prin depunerea unor pelete dintr-un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol (Poloxamer 407/Pluronic® F127, BASF AG, Ludwigshafen, Germania). Se introduc 30 g de Poloxamer 407 în 70 ml mediu decoct de cartof-dextroză și se lasă peste noapte la frigider pentru hidratare și omogenizare. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, după care se răcește pentru lichefiere până la 4°C. Poloxamerul 407 are proprietăți de gelifiere termoreversibile. Soluțiile de 30% Poloxamer 407 sunt lichide la temperaturi mai mici de 15°C și se solidifică la temperaturi mai mari de 15°C. Mediul hidrogelifiat se sterilizează prin autoclavare, și apoi se adaugă micro-elementele, prin diluarea unor soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare, adăugate în volumele necesare pentru atingerea concentrației finale în mediul de cultură.

Se adaugă aseptice, peste filmul detector pentru determinarea eliberării de celobioză din materialul vegetal lignocelulozic, 47,4 ml de mediul minimal M9 - pulbere de tulpini de porumb - poloxamer, pentru a forma un strat de mediu de cultură cu grosime de 6 mm.

Acest strat superior de mediu de cultură hidrogelifiat cu poloxamer se inoculează cu 12 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții. Inocularea se realizează cu mici cantități de inocul lichid, prelevat cu ajutorul unui replicator de inox cu 96 pini (MULTI - BLOT™ Replicator System, V&P Scientific, San Diego, CA, SUA), dintr-o placă cu 96 godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor/izolatelor de testat, conform celor descrise în continuare. Într-o placă cu 96 godeuri se distribuie aseptice tampon fosfat salin steril, câte 225 μl în fiecare godeu. Culturi reîmprospătate din tulpinile de testat, realizate pe mediu lichid decoct de cartof - glucoză, timp de 24 h în cazul procariotelor (bacterii, gram-negative sau gram-pozitive, cianobacterii), și de 24 h în cazul altor microorganisme, se normalizează prin diluție la 10<sup>7</sup> ufc/ml. Din aceste culturi se preiau 25 μl, care se aduc axenic peste cei 225 μl tampon fosfat salin steril, conform schemei de randomizare prezentate în tabelul de mai jos:

*Schema de randomizare a celor 12 tulpini în 8 repetiții aplicată pentru placa cu 96 godeuri*

|   | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | 6  | 11 | 2  | 7  | 12 | 3  | 8  | 9  | 4  | 5  | 10 | 1  |
| B | 12 | 3  | 7  | 9  | 4  | 8  | 10 | 1  | 5  | 11 | 2  | 6  |
| C | 4  | 8  | 9  | 1  | 5  | 10 | 2  | 6  | 11 | 3  | 7  | 12 |
| D | 8  | 12 | 1  | 5  | 11 | 4  | 6  | 10 | 3  | 7  | 9  | 2  |
| E | 11 | 4  | 5  | 10 | 3  | 6  | 9  | 2  | 7  | 12 | 1  | 8  |
| F | 3  | 6  | 10 | 2  | 7  | 9  | 1  | 8  | 12 | 4  | 5  | 11 |
| G | 7  | 10 | 4  | 6  | 9  | 1  | 5  | 12 | 2  | 8  | 11 | 3  |
| H | 9  | 1  | 6  | 12 | 2  | 5  | 11 | 3  | 8  | 10 | 4  | 7  |

Replicatorul de inox se sterilizează prin flambare, se răcește și apoi se scufundă în placa de 96 godeuri, în care s-a realizat axenic, în mediu lichid, diluarea și randomizarea tulpinilor/izolatelor de testat. Pe fiecare pin se preiau câte 10...20 μl de inocul lichid, cu 10<sup>6</sup> ufc/ml, datorită aderenței lichidului la suprafața metalului. Această mică cantitate de inocul este transferată pe stratul superior de mediu de cultură hidrogelifiat cu poloxamer, prin presarea ușoară a replicatorului cu 96 pini pe suprafața respectivului mediu de cultură.

# RO 131224 B1

1 Placa inoculată se incubă timp de 60...120 h, la temperaturi 30°C, în funcție de tipul  
de tulpini testate. Din 12 în 12 h se preiau imaginile: stratului detector din partea de jos și,  
3 respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, cu ajutorul unui  
sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).

5 În paralel, se realizează o placă martor, în care fiecare colonie din izolatele/tulpinile  
microbiene testate se dezvoltă separat. Filmul detector cu o grosime de 2 mm se distribuie  
7 pe un capac de placă de microtitrare (Nune™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA).  
Pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri, în care partea inferioară este o membrană de  
9 ultrafiltrare (MultiScreen® Filter Plate with Ultracel® - 10 Membrane, Merck Millipore, Merck,  
Darmstadt, Germania) se distribuie câte 245 µl de mediu minimal M9 - pulbere de tulpini de  
11 porumb - poloxamer, pentru a forma un strat cu grosime de 6 mm. Cele 12 tulpini/izolate  
distribuite randomizat în 8 repetiții, conform tabelului, se inoculează cu ajutorul unui  
13 replicator cu 96 pini, care a fost în prealabil sterilizat prin flambare.

15 Plăcile martor cu 96 godeuri, în care microorganismele inoculate se dezvoltă  
individual, fără a interacționa, se incubă timp de 60...120 h, la aceeași temperatură ca plăcile  
cu un singur godeu, în care microorganismele interacționează. Din 12 în 12 h se preiau  
17 imaginile: stratului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme  
dezvoltate pe stratul superior, în fiecare godeu, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare  
19 (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).

21 Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii se prelucrează cu ajutorul  
softului specializat, open acces, Colonyzer (Lawless et al. 2010, BMC Bioinformatics, 11,  
287). Se obțin date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office, Microsoft, Redmond,  
23 WA, SUA), separat pentru dezvoltarea coloniilor și pentru formarea suprafeței colorate ca  
urmare a interacțiunii celobiozei eliberate din materialul lignocelulozic cu filmul detector. Se  
25 compară suprafețele coloniilor și, respectiv, ale suprafețelor colorate din filmul detector, în  
proba cu 12 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat  
27 în interacțiune reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care  
fiecare tulpină/izolat de testat s-a dezvoltat separat. Se identifică, prin analiza variantei  
29 (ANOVA, StatSoft - Dell Software, Tulsa, OK, SUA), microorganismele care interacționează  
reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, și, respectiv, în producerea de  
31 celobioză din materialul lignocelulozic.

## Exemplul 2

33 Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că sferile coloidale monodisperse  
imprentate molecular, utilizate pentru filmul detector, se prepară prin polimerizare în emulsie,  
35 fără emulgator, folosind 0,41 g de fenilcoumaran (2-Phenyl-2,3-dihydro-1-benzofuran,  
Chemstep, Martillac, Franța) pentru imprentare.

## Exemplul 3

37 Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că sferile coloidale monodisperse  
imprentate molecular, utilizate pentru filmul detector, se prepară prin polimerizare în emulsie,  
39 fără emulgator, folosind 0,35 g de acid *p*-coumaric (acid trans-4-hidroxicinnamic, Sigma  
Aldrich).  
41

## Exemplul 4

43 Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: sferile coloidale  
monodisperse imprentate molecular, utilizate pentru filmul detector, se prepară prin  
45 polimerizare în emulsie, fără emulgator, folosind 0,34 g de putresceină (hidroclorură de 1,4-  
diaminobutan, Sigma Aldrich); sursa de carbon și energie din mediul minimal este pulbere  
47 micronizată de tulpini de mazărice de toamnă, *Vicia villosa*, iar incubarea se realizează la  
24°C.

# RO 131224 B1

## Exemplul 5

Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: sferile coloidale mono-disperse impregnate molecular, utilizate pentru filmul detector, se prepară prin polimerizare în emulsie, fără emulgator, folosind 0,56 g de oligalacturonide cu 10 resturi de galacturonosil legate  $\alpha$ -1,4 (oligozaharine); sursa de carbon și energie din mediul minimal este pulbere micronizată de tulpini de mazărice de toamnă, *Vicia villosa*, iar incubarea se realizează la 24°C. Oligozaharinele se obțin prin purificarea pe coloane de schimbători de ioni DEAE-Sephadex (Sigma-Aldrich) a unui hidrolizat de acid poligalacturonic (Sigma-Aldrich) cu pectin-liază din *Aspergillus japonicus* (Sigma-Aldrich).

## Exemplul 6

Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: sferile coloidale mono-disperse impregnate molecular, utilizate pentru filmul detector, se prepară prin polimerizare în emulsie, fără emulgator, folosind 0,18 g de acid butiric (Sigma); sursa de carbon și energie din mediul minimal este pulbere micronizată de amestec de părți aeriene verzi ai unei graminee perene, *Festuca pratensis*, și ai unei leguminoase perene *Trifolium repens*, în proporții egale, iar incubarea se realizează la 35°C, în anaerobioză (folosind containere pentru anaerobioză GasPak EZ, BD, NJ, SUA).

## Exemplul 7

Se lucrează ca în exemplul 6, folosind pentru impregnarea sferelor coloidale 0,16 g de acid propinionic (Sigma).

# RO 131224 B1

## Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

15

17

19

21

23

25

27

29

31

33

35

37

39

41

43

45

47

1. Metodă de selecție a consorțiilor de microorganisme destinate tratamentului materialului vegetal, **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din următoarele etape: depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu a unui film detector cu răspuns specific la componentele eliberate din materialul lignocelulozic sub acțiunea izolatelor/tulpilor testate; adăugarea aseptică peste filmul detector a unui mediu minimal sterilizat, cu o grosime de 6 mm, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat, ca unică sursă de carbon și energie, și care este hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol; inocularea în condiții axenice a mediului minimal hidrogelifiat, cu 12 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții; incubarea timp de 60...120 h a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii gelului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate în partea de sus, din 12 în 12 h; realizarea unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele/tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat, prin inocularea în condiții axenice, a celor 12 tulpini/izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri, cu partea interioară deschisă, așezată peste filmul detector cu răspuns specific la componentele de interes, și care conține în fiecare godeu aceeași grosime de mediul minimal hidrogelifiat, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat ca unică sursă de carbon; incubarea timp de 60...120 h a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii gelului detector din partea de jos și a coloniilor de microorganisme dezvoltate în partea de sus, din 12 în 12 h; analiza imaginilor prelevate și compararea rezultatelor din proba cu 12 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacțiune reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină/izolat de testat s-a dezvoltat separat, și identificarea microorganismelor interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, respectiv în producerea compușilor de interes din materialul lignocelulozic, evidențiați specific de gelul detector.

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** filmul detector are grosimea de 2 mm și include un strat de cristal polimeric coloidal fonic detector care se obține prin preluarea cu un film adeziv, de pe o suprafață de sticlă, a unei matrici coloidale impregnate molecular, formată pe respectiva suprafață prin cristalizarea unei suspensii de sfere coloidale impregnate molecular, preparată prin polimerizare în emulsie fără agent emulsifiant.

3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** moleculele folosite pentru impregnarea moleculară a sferelor coloidale impregnate molecular sunt: celobioza,  $\beta$ -5/ $\alpha$ -O-4 fenilcoumaranul sau acidul *p*-coumaric, atunci când se urmărește detectarea consorțiilor de microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; putresceina sau oligalacturonide cu 10 resturi de galacturonosil legate  $\alpha$ -1,4, pentru identificarea consorțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; acidul butiric și acidul propionic, în cazul selecției consorțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor însilozate.

4. Metodă conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul lignocelulozic micronizat folosit ca sursă unică de carbon și energie în mediul minimal este reprezentat de pulbere micronizată de: tulpini de porumb, *Zea mays*, pretratate prin expandarea fibrelor cu amoniac în cazul selecției consorțiilor microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; tulpini de

# RO 131224 B1

măzărice de toamnă, *Vicia villosa*, pentru identificarea consorțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; amestec de părți aeriene verzi ale unei graminee perene, *Festuca pratensis*, și ale unei leguminoase perene *Trifolium repens*, în proporții egale, în cazul selecției consorțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor însilozate. 1  
3  
5

5. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** incubarea se face la temperatura de 30°C și în condiții de aerobioză, în cazul selecției consorțiilor microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; la 24°C și în condiții de aerobioză, pentru identificarea consorțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; la 35°C și în condiții de anaerobioză, în cazul selecției consorțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor însilozate. 7  
9  
11



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 445/2019