



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

(71) Solicitant:
• **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**

(54) **PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU SELECȚIA
CONSORȚIILOR DE MICROORGANISME DESTINATE
TRATAMENTULUI MATERIALULUI VEGETAL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru selecția consoțiilor de microorganisme destinate tratamentului materialului vegetal. Procedeu conform invenției este alcătuit din etapele de: depunere pe o placă având un singur godeu a unui film detector; adăugarea peste filmul detector a unui mediu minimal, 1 g la 100 ml material celulozic hidrogelificat cu un tribloc copolimer; inocularea cu 12 izolate de testat randomizate în 8 repetiții; incubarea timp de 60...120 h a plăcii, cu prelevarea imaginii filmului detector și, respectiv, a coloniilor de microorganisme, din 12 în 12 ore; realizarea în aceleași condiții a unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele testate se dezvoltă separat,

prin inocularea celor 12 izolate în 8 repetiții, pe o placă având 96 godeuri, cu partea inferioară deschisă, așezată peste filmul detector, și care conține, în fiecare godeu, același mediu minimal hidrogelificat; analiza imaginilor prelevate; compararea rezultatelor din proba cu izolatele dezvoltate în interacție reciprocă, în placa având un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare izolat de testat s-a dezvoltat separat; identificarea microorganismelor care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, respectiv, în producerea compușilor de interes din materialul lignocelulozic.

Revendicări: 5

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).



PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU SELECȚIA CONSORȚIILOR DE MICROORGANISME DESTINATE TRATAMENTULUI MATERIALULUI VEGETAL

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

Sunt cunoscute diferite procedee pentru screening-ul de înalt randament al tulpinilor / izolatelor de microorganisme care produc enzime / complexe proteice cu rol în degradarea componentelor materialului vegetal. Cererea de brevet WO2013135245 A1 descrie un procedeu de screening de înalt randament pentru glicozil-hidrolaze (celulaze, pectinaze, hemicelulaze). În acest procedeu se amestecă o probă (candidat), conținând enzime cu activitate glicozil-hidrolazică, cu un substrat complex de material vegetal, se incubă amestecul pentru ca enzimele și polizaharidele / carbohidrații din materialul vegetal să interacționeze, și apoi se compară compoziția de carbohidrați rezultată cu cea inițial existentă în substrat. Probele pot fi reprezentate de microorganisme izolate din mediu, nemodificate genetic, din microorganisme supuse diferitelor tipuri de mutagenză, controlată sau necontrolată, sau din microorganisme modificate genetic. Aceste probe pot fi suplimentate cu inhibitori sau potențiatori cunoscuți ai activității glicozil-transferazelor - module de legare a carbohidraților (*carbohydrate binding modules*, CBMs), expansine sau „amplificatori de celulază” („*cellulose enhancers*”), inclusiv familia 61 de proteine produsă de *Trichoderma reesei*.

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 leganzi, cu specificitate de legare pentru ligandul carbohidrat specific (ca de ex. anticorpi monoclonali anti-liganzi cu

specificitate de carbohidrat). Setul de liganzi cu specificitate de legare este, eventual, marcat.

Procedeul se poate realiza de ex. și prin utilizarea unor plăci de microtitrare standardizate, cu 96, 384 sau 1536 godeuri, dar cererea de brevet WO2013135245 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-etalare 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 enzimatică, liganzii cu specificitate de carbohidrat, și liganzii secundari, specifici liganzilor inițiali.

Cererea de brevet CN102212608 se referă la un procedeu de screening de înalt randament care utilizează plăci de 96 godeuri. În fiecare din godeuri se determină activitatea celulazică din diferite supematante (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 celulelor testate.

Cererea de brevet EP1230348 A1 prezintă un procedeu de înalt randament pentru screening-ul populațiilor celulare care produc diferite tipuri de molecule de interes. Procedeul 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 ex. 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. Procedeul este revendicat și pentru screening-ul 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 poliacrilamidă (în locul agenților uzuali de gelifiere), cu omogenat de tulpini de porumb pre-tratate 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 poliacrilamida, 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 poliacrilamida nu este cel mai convenabil agent de gelifiere al mediilor utilizate pentru screening izolatelor de microorganisme cu capacitate ridicată de degradare a materialului lignocelulozic.

Nu s-au descris până acum procedee de înalt randament prin care să se selecteze consorții de microorganisme care produc enzime și/sau complexe proteice non-catalitice cu acțiune sinergică / complementară în degradarea materialului vegetal. Cererea de brevet WO2004083409 A1 revendică inclusiv procedeul prin care a fost selectat consorțiul format din tulpinile de microorganisme CBTCC/5203, CBTCC/5303 și CBTCC5403, depozitate la IMTECH, Chandigarh, India, cu numerele de acces MTCC 5094, MTCC 5095 și MTCC 5098, care au capacitate de degradare a ligninei. Procedeul constă în următoarele etape: a) îmbogățirea florei bacteriene din arealul folosit pentru prelevare; b) izolarea bacteriilor ligninolitice folosind diferite medii; c) cultivarea bacteriilor izolate în diferite condiții de mediu, temperatură, pH-ul, sursa de carbon etc.; d) verificarea capacității izolatelor de degradare a ligninei prin inocularea izolatelor bacteriene în 10 ml de lignină 0,4%; e) selectarea izolatelor bacteriene care decolorează ligninei în mod eficient; f) adaptarea celor care sunt eficiente la cultivarea pe lignină g) cultivarea tulpinilor bacteriene în amestec pentru a se vedea interacțiunile / efectul lor sinergic în degradarea ligninei; h) selectarea consorțiului microbial care cuprinde cele trei izolate bacteriene. Un astfel de

procedeu nu este un procedeu de înalt randament, pentru că este prea laborios și nu se poate aplica într-un timp scurt, pe matrici de izolate / tulpini de testat.

Consoțțiile de microorganisme care degradează lignoceluloza includ tulpini care produc diferite tipuri de enzime și/sau potențiatori ai acestora. Un procedeu de screening de înalt randament ar trebui să permită identificarea rapidă a interacțiilor acestor proteine secretate de microorganisme în degradarea lignocelulozei. Intrucât competiția domină în consoțțiile microbiene implicate în degradarea materialului vegetal lignocelulozic (Foster și Bell, 2012, *Curr. Biol.* 22: 1845–1850), procedeu de screening ar trebui să asigure și identificarea rapidă a tulpinilor de microorganisme compatibile, inclusiv a celor care se stimulează reciproc în dezvoltare.

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

Cererea de brevet US 20120107915 protejează un procedeu de screening rapid al tulpinilor de microorganisme antagoniste față de agenții fitopatogeni, care implică utilizarea unor platforme multitest. Platformele multitest includ între 12 și

1500 de izolate, etalate pe un mediu de cultură într-o micro-matrice în care sunt distribuite și microorganismele 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.

Procedul descris prin cererea de brevet RO127470 A2 permite identificarea tulpinilor care stimulează dezvoltarea plantelor de cultură; procedul implică monitorizarea a doi parametri fiziologici, corelabili, determinați prin metode diferite, ale culturilor de microorganisme și de țesuturi vegetale, expuse reciproc la compușii care difuzează în mediu. Nici acest procedeu nu permite însă identificarea rapidă a consorțiilor compatibile care secretă exo-proteine cu efect sinergic / complementar în degradarea materialului vegetal.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu prin care să se identifice rapid consorțiile de microorganisme mutualiste care produc amestecuri de enzime cu activitate de degradare a lignocelulozei și/sau potențatori ai acestora.

Noțiunea de „consorții de microorganisme mutualiste” se referă la comunitățile de microorganisme, procariote (bacterii, gram-negative sau gram-pozitive, cianobacterii) și/sau arhee (de ex. microorganisme extremofile) și/sau eucariote (drojdii / levuri, fungi, alge), în care interacțiile biologice sunt reciproc benefice.

„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 simpli de asimilat de microorganisme, esteraze care eliberează acizii cinamici esterificați cu porțiunile terminale ale hemicelulozelor (porțiuni esterificate care stabilesc interacții de tip pi cu lignina, între porțiunea fenolică a acizilor cinamici și resturile fenolice ale ligninei).

„Potențiatorii enzimelor cu activitate de degradare a lignocelulozei” se referă la proteine cu activitate non-catalitică care slăbesc structurile de ordin superior ale fibrelor de celuloză prin desfacerea legăturilor de hidrogen (cum sunt de ex. cerato-plataninele, recent trecute în revistă de Gader *et al.* 2014, Appl.

Microbiol. Biotechnol. 98:4795-4803), 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.

Este un alt scop al acestei invenții de a prezenta o variantă prin care procedeul conform invenției să fie utilizat pentru identificarea rapidă a consorțiilor de microorganisme mutualiste care degradează materialul vegetal, cu producerea de compuși care au o acțiune biostimulantă asupra plantelor cultivate.

„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.

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).

„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.

„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 (DAMPs - *danger-associated molecular patterns* – a se vedea de ex. review-ul Boller și Felix, 2009, Annu. Rev. Plant Biol. 60:379–406). Diferite tipuri de oligozaharide eliberate ca fragmentele din materialul lignocelulozic supus acțiunii de degradare a microorganismelor / complexelor enzimatică produse de acestea au o similitudine pronunțată cu DAMPs.

„Oligozaharinele” sunt compuși rezultați prin degradarea peretelui celular vegetal / materialului lignocelulozic, în special oligalacturonide formate prin hidroliza pectinei, 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 vedea de ex. review-ul Cabrera *et al.*, 2013, Acta Hort., 1009, 195-212).

Este un alt scop al acestei invenții de a prezenta o variantă prin care procedeul conform invenției să fie utilizat pentru identificarea rapidă a consorțiilor de microorganisme mutualiste care prezintă antagonism față de microorganismele fitopatogene care includ în ciclul lor de dezvoltare o etapă de dezvoltare pe resturile vegetale.

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

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

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

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ 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 răspuns specific la componentele de interes, eliberate din materialul lignocelulozic sub acțiunea izolatelor / tulpinilor 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, prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini din oțel inox, a 10...20 μ 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 tulpinilor / izolatelor de testat;

✓ Incubarea timp de 60 - 120 ore a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii gelului 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 ore;

✓ 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 nm, 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 hidrogelifiat, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat ca unică sursă de carbon;

✓ Incubarea timp de 60 - 120 ore 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 ore;

✓ Analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor soft-uri specializate, compararea rezultatelor din proba cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție 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.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

✓ 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 plimerizare în emulsie fără agent emulsifiant;

✓ Moleculele folosite pentru impregnarea moleculară a sferelor coloidale impregnate molecular sunt: celobioza, β -5/ α -O-4 fenilcoumaranul sau acidul p-coumaric, atunci când se urmărește detectarea consoțiilor de microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; putresceina sau oligalacturonide cu 10 resturi de galacturonosil legate α -1,4, pentru identificarea consoțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; acidul butiric și acidul propionic, în cazul selecției consoțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor însilozate.

✓ 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*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac în cazul selecției consoțiilor de microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; tulpini de măzăriche de toamnă, *Vicia villosa*, pentru identificarea consoțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; amestec de părți aeriene verzi ai unei graminee perene, *Festuca pratensis*, și ai unei leguminoase perene *Trifolium repens*, în proporții egale, în cazul selecției consoțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor însilozate;

✓ Incubarea se face la temperatura de 30°C și în condiții de aerobioză, în cazul selecției consoțiilor de microorganisme mutualiste pentru degradarea materialului celulozic în vederea procesării prin biorafinare; la 24°C și în condiții de aerobioză, pentru identificarea consoțiilor de microorganisme mutualiste utile pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă; la 35°C și în condiții de anaerobioză, în cazul selecției consoțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor însilozate.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Realizarea concomitentă a screening-ului 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 lignocelulozic, interacția biologică cu alte tulpini / izolate, respectiv antagonism, neutralism, mutualism;

- Asigurarea statistică a experimentelor datorită utilizării unor scheme de testare randomizată, compatibile cu modelele de analiza varianței;
- Posibilitatea evidențierii interacțiilor dintre microorganisme care se dezvoltă în structuri de tip biofilm, similare celor naturale, datorită mediului hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer; în structurile de tip biofilm microorganismele prezintă rezistență sporită la factorii de mediu, inclusiv antagonism.

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

Exemplul 1. Se prepară sferile coloidale monodisperse impregnate molecular, utilizate pentru filmul detector, prin polimerizare în emulsie, fără emulgator. Într-un balon cu fund plat de 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 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 (β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc, 4-O- β -D-Glucopiranosil-D-glucoză. (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 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 refluxare pentru 45 min, După polimerizare, sferile coloidale impregnate molecular se separă de emulsia rezultată prin centrifugare la 500 x g pentru 10 min. Pentru a înlătura moleculele matriță folosite pentru impregnarea moleculară sferile coloidale au fost spălate repetat, cu soluții de acid acetic – metanol - apă (1:4:4), soluție apoasă de metanol 50% (v/v) și apă dublu distilată sterilă. Sferile 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 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 în timp de 24 ore 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 Adhesive Sealer, Thermo Fisher Scientific). Filmul adeziv se transferă

aseptic pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu, și formează stratul detector, cu o grosime de 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 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. Această modificare a lungimii de undă de difracție este percepută ca o modificare a culorii matricei de cristal fonic.

Se prepară un mediu minimal M9 care conține la 1 litru: Na₂HPO₄ (anhidru) 6 g; KH₂PO₄ 3 g; NaCl 0.5 g; NH₄Cl 1 g, 10 g pulbere micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac, și nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,1 mM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 3x10⁻⁹ M; H₃BO₃ 4x10⁻⁷ M; CoCl₂ · 6 H₂O 3x10⁻⁸ M; CuSO₄·5H₂O 1x10⁻⁸ M; MnCl₂·4H₂O 8x10⁻⁸ M; ZnSO₄·7H₂O 1x10⁻⁸ M; FeSO₄·7H₂O 1x10⁻⁶ M. (Reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). Se realizează mai întâi mediul cu principalele săruri și pulberea micronizată de tulpini de porumb, se aduce pH la 7,4 cu NaOH,.

Mediul se hidrogelifică prin depunerea unor pelete dintr-un tribloc copolimer, 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 hidrogelificat se sterilizează prin autoclavare, și apoi se adaugă microelementele, 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 hidrogelificat 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 de 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 de godeuri se distribuie aseptice tampon fosfat salin steril, câte 225 μl în fiecare godeu. Culturi re-împrospătate din tulpinile de testat, realizate pe mediu lichid decoct de cartof – glucoză, timp de 24 ore în cazul procariotelor (bacterii, gram-negative sau gram-pozitive, cianobacterii) și de 24 ore în cazul altor microorganisme, se normalizează prin diluție la 10⁷ 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 prezentată în tab. 1 de mai jos.

Tab.1. 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 10⁶ ufc/ml, datorită aderenței lichidului la suprafața metalului. Această mică cantitate de inocul este transferată pe stratul superior de mediu de cultură hidrogelificat cu poloxamer, prin presarea ușoară a replicatorului cu 96 pin pe suprafața respectivului mediu de cultură.

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

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 pe un capac de placă de microtitrare (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA). Pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri, în care partea inferioară este o membrană de 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 porumb - poloxamer, pentru a forma un strat cu grosime de 6 mm. Cele 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, conform tab.1, se inoculează cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, care a fost în prealabil sterilizat prin flambare.

Plăcile martor cu 96 de godeuri, în care microorganismele inoculate se dezvoltă individual, fără a interacționa, se incubă timp de 60 - 120 ore, la aceeași temperatură ca și plăcile cu un singur godeu, în care microorganismele interacționează. Din 12 în 12 ore se preiau 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 (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).

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, WA, SUA), separat pentru dezvoltarea coloniilor și pentru formarea suprafeței colorate ca urmare a interacției celobiozei eliberate din materialul lignocelulozic cu filmul detector. Se 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 în interacție 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 varianței (ANOVA, StatSoft - Dell Software, Tulsa, OK, SUA) microorganismele care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, și respectiv în producerea de celobioză din materialul lignocelulozic.

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

Exemplu 3. Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că sferile coloidale monodisperse impregnate molecular, utilizate pentru filmul detector, se prepară prin polimerizare în emulsie, fără emulgator, folosind 0,35 g de acid p-coumaric (acid trans-4-hidroxicinnamic, Sigma Aldrich).

Exemplu 4. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: sferile coloidale monodisperse impregnate molecular, utilizate pentru filmul detector, se prepară prin 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 micronizată de tulpini de măzărice de toamnă, *Vicia villosa*, iar incubarea se realizează la 24°C.

Exemplu 5. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: sferile coloidale monodisperse 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 α -1,4 (oligozaharine); sursa de carbon și energie din mediul minimal este pulbere micronizată de tulpini de măzărice 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).

Exemplu 6. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: sferile coloidale monodisperse 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).

Exemplu 7. Se lucrează ca în exemplul 6, folosind pentru impregnarea sferelor coloidale 0,16 g de acid propinionic (Sigma).

Revendicări

1. Procedeu de înalt randament pentru selecția consorțiilor de microorganisme destinate tratamentului materialului vegetal **caracterizat prin aceea că** este alcătuit 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 ore a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii gelului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltare în partea de sus, din 12 în 12 ore; 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 mediu minimal hidrogelifiat, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat ca unică sursă de carbon; incubarea timp de 60 - 120 ore a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii gelului detector din partea de jos și a coloniilor de microorganisme dezvoltare în partea de sus, din 12 în 12 ore; 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 interacție 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. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat 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. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** moleculele folosite pentru impregnarea moleculară a sferelor coloidale impregnate molecular sunt: celobioza, β -5/ α -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 α -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. Procedeu 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*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac în cazul selecției consorțiilor microorganisme 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 ai unei graminee perene, *Festuca pratensis*, și ai unei leguminoase perene *Trifolium repens*, în proporții egale, în cazul selecției consorțiilor de microorganisme mutualiste destinate inoculării furajelor însilozate;

5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat 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.