



(11) **RO 131828 B1**

(51) **Int.Cl.**

C12N 1/00 (2006.01);

C12N 1/22 (2006.01);

C12N 1/14 (2006.01);

C12N 1/20 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00926**

(22) Data de depozit: **27/11/2015**

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

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. **5/2017**

(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 131225 A; FRANSON M. A.,
"HETEROPOLY BLUE METHOD FOR THE
DETERMINATION OF SILICON IN WATER
AND WASTEWATER", STANDARD
METHODS FOR THE EXAMINATION OF
WATER AND WASTEWATER, 18th ED, PP.
4-121, 1992; GOSSELIN R. E., SMITH R. P.,
HODGE H. C., "COLORIMETRIC
MOLYBDATE BLUE METHOD FOR THE
DETERMINATION OF SILICA IN WATER
AND WASTEWATER", CLINICAL
TOXICOLOGY OF COMMERCIAL
PRODUCTS. 5th ED., CAP. II, P. 95,
BALTIMORE, 1984**

(54) **PROCEDEU DE SELECȚIE A CONSORTIILOR
DE MICROORGANISM CARE ELIBEREAZĂ
ȘI SOLUBILIZEAZĂ BIOSILICIUL DIN MATERIALUL
VEGETAL**

Examinator: inginer biotehnolog CHECIU CRĂIȚA ELENA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 131828 B1

RO 131828 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de selecție a consorțiilor de
microorganism care eliberează și solubilizează biosiliciul din materialul vegetal, având
3 aplicații în sistemele agricultură conservativă. Microorganismele selectate conform
procedului descris, au concomitent caracteristici superioare de: (i) degradare a matricei
5 lignocelulozice, cu eliberarea biosiliciului inclus în această matrice, și (ii) solubilizare prin
complexare a respectivei forme de siliciu.

7 Sunt cunoscute diferite procedee prin care se solubilizează biosiliciul din materialul
vegetal, pentru a fi reutilizat ca sursă de nutrienți pentru plante. În pofida abundenței sale în
9 scoarța pământului, rezervorul de siliciu biodisponibil pentru plante în sol este limitat,
reciclarea biosiliciului fiind esențială pentru asigurarea pe termen lung a fertilității solurilor
11 (**Haynes, 2014, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 177: 831-844**). Rolul benefic
al siliciului pentru plante a fost demonstrat prin utilizarea unor mutante care au o capacitate
13 redusă de preluare a siliciului din sol (**Ma și Yamaji, 2015. Trends in Plant Science,**
20: 435-442). Exportul de siliciu din sol prin biomasa recoltată de plante cultivate, fără
15 reciclare, determină reducerea rezervorului de siliciu solubil/biodisponibil (**Vandevenne,**
2012, Frontiers in Ecology and the Environment, 10: 243-248), iar preconizata utilizare
17 pe scară largă în procesele de biorafinare a resturilor vegetale, în special a celor cu un
conținut ridicat de biosiliciu, cum sunt paiele de grâu sau tuleii de porumb, va accentua
19 fenomenele de desiliciere a solurilor. Pe de altă parte, biosiliciul complică utilizarea
materialului vegetal în procesele de biorafinare (**Le et al. 2015, Biofuels, Bioproducts and**
21 **Biorefining, 9: 109-121**).

Sunt necesare, așadar, procedee prin care să se recupereze biosiliciul din materialul
23 vegetal, sub forme cu biodisponibilitate cât mai ridicată. Optim ar fi ca această recuperare
să se realizeze în cadrul etapelor de pre-tratament al materialului vegetal, premergătoare
25 biorafinării propriu-zise.

27 Cererea de brevet **RO 131225 A2** se referă la un procedeu de selecție a consorțiilor
de microorganisme capabile să producă anumiți compuși cu rol de stimulare a plantelor
cultivate, care răspund specific prin producerea suplimentară de compuși biostimulanți, la
29 exo-semnalele prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste, destinate
contracării stresurilor biotice și abiotice.

31 *“Heteropoly Blue Method for the determination of silicon in water and wastewater”* -
Franson MA, ed; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed,
33 pp. 4-121 (1992), descrie o metodă de evidențiere a dioxidului de siliciu cu ajutorul
molibdatului de amoniu, la un pH de aproximativ 1,2.

35 *“Colorimetric Molybdate Blue Method for the determination of silica in water
and wastewater”* - Gosselin, R.E., R.P. Smith, H.C. Hodge. **Clinical Toxicology of**
37 **Commercial Products. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, pp. 11-95**, descrie
o metodă colorimetrică ce folosește molibdatul de amoniu pentru determinarea siliceii în apă
39 și în apele uzate. Silicea în soluție ca acid silicic sau silicat are proprietatea de a reacționa
cu molibdat de amoniu într-un mediu acid pentru a forma complexul galben de silicomolibdat,
41 care este apoi redus cu sulfit de sodiu pentru a forma culoarea albastru de molibdat.

Brevetul **CN 102260116** se referă la un procedeu de recuperare a biosiliciului din
43 pleava de orz, care implică: amestecarea a 50...75% pleavă orz cu 0,5...1,5% consorțiu
microbian și cu apă până la 100%; fermentarea semisolidă a amestecului timp de 72 h;
45 extracția substratului fermentat, cu 20% (procente de masă) soluție NaOH, la 95°C timp de
6 h; filtrarea pentru a îndepărta reziduurile după extracție și obținerea extractului de biosiliciu.

RO 131828 B1

Consoțriul microbial este alcătuit din *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus*, și drojdie într-un raport în greutate de: 50 până la 80%, 0 până la 50% și, respectiv, 0 până la 35%. Nu sunt revendicate tulpini specifice de microorganisme, selectate pentru activitatea specifică, prin care să se realizeze eliberarea maximă a biosiliciului din matricea lignocelulozică a materialului vegetal. Procedul de extracție a biosiliciului implică utilizarea unei soluții alcaline, la temperaturi ridicate. Brevetul nu descrie utilizarea ulterioară a materialului vegetal extras în procedee de biorafinare.

Brevetul **US 8026086** prezintă un procedeu prin care se produc concomitent siliciu și cel puțin un alt produs chimic de interes industrial, cum ar fi etanolul, care include următoarele etapele: pre-tratarea materialului vegetal cu conținut ridicat de siliciu, de exemplu plante de coada calului din genul *Equisetum*, pentru a crea o materie primă cu celuloza expusă; introducerea respectivei materii prime într-un reactor, conținând un agent biologic eficient în desfacerea celulozei în cel puțin un produs util pentru reacțiile chimice ulterioare, și un co-produs care conține siliciu; separarea a cel puțin unui produs util organo-chimic în reactor; separarea co-produselor care conțin biosiliciu și rafinarea acestora la silice sau alte forme de siliciu cu utilizări industriale. Agentul biologic utilizat poate fi constituit din bacterii anaerobe termofile (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermodydrosulfuricum* și *Thermoanaerobacter ethanolicus*), enzime (în special cu activitate celulozolică, produse, de exemplu, de *Trichoderma reesei*), sau un amestec de enzime și drojdii. Nici în cazul acestui brevet nu sunt revendicate tulpini specifice de microorganisme, selectate pentru activitatea specifică ridicată, prin care să se realizeze eliberarea maximă a biosiliciului din matricea lignocelulozică a materialului vegetal. Materialul vegetal rezultat după extragerea biosiliciului este utilizat pentru biorafinare, dar biosiliciul este utilizat pentru producere de carbură de siliciu sau tetraclorură de siliciu, și nu pentru obținerea de produse utilizabile ca inputuri în tehnologiile agricole.

Nu au fost descrise până în prezent procedee prin care să se realizeze selecția microorganismelor care au concomitent caracteristici superioare de: (i) degradare a matricei lignocelulozice, cu eliberarea biosiliciului inclus în această matrice, și (ii) de solubilizare prin complexare a respectivului siliciu. În materialul vegetal, siliciul se regăsește sub două forme: complexat în matricea extracelulară (**He et al. 2015. New Phytologist, 206: 1051-1062**) sau precipitat ca dioxid de siliciu amorf, $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Epstein 1999, Annual Review of Plant Biology, 50; 641-664). Solubilizarea siliciului amorf se realizează sub acțiunea silicazei, o polipeptidă care catalizează interconversia dintre diferitele forme de dioxid de siliciu/silice, inclusiv cel amorf, și acidul silicic, care a fost identificată și în tulpini bacteriene din genurile *Methanosarcina* și *Bacillus* (Brevet **US 8822188**). Eliberarea siliciului din complexe sale cu constituenții matricei lignocelulozice implică complexanți cu o mai mare afinitate pentru siliciu. Complexanții siliciului cresc biodisponibilitatea acestuia pentru plante (Cerere de brevet **US 20140116103**). De asemenea, există evidențe care sugerează translocarea prin xilem a acidului monosilicic sub formă complexată. Concentrația acidului monosilicic în xilem este uneori cu mult peste limita de solubilitate (circa 2 mM) în apă, fără a se produce formarea precipitatelor de silice coloidală (**Mitani și Ma 2005, Journal of Experimental Botany, 56: 1255-1261**).

S-a demonstrat că o serie de catecolați naturali, ca, de exemplu, acidul protocatehuic/acidul 3,4-dihidroxibenzoic sau acidul galic/acidul 3,4,5-trihidroxibenzoic (**Demadis et al 2011, Industrial & Engineering Chemistry Research, 50: 13866-13876**) sau o serie de aminoacizi ca histidina sau fenil-alanina (**Demadis și Mavredaki, 2005, Environmental Chemistry Letters, 3: 127-131**) au capacitatea de a crește rata de dizolvare

RO 131828 B1

1 a siliciul din silicea amorfă, prin formare de complecși. Catecolații au fost raportați ca fiind
siderofori pentru bacterii care au efecte de favorizare a creșterii plantelor și de activare a
3 sistemului de apărare din plante (**Aznar și Dellagi 2015, Journal of Experimental Botany,**
66: 3001-3010). Aminoacizii sunt biostimulanți pentru plante (**Calvo et al 2014, Plant and**
5 **Soil, 383: 3-41**). Așadar, tulpinile de microorganisme care solubilizează siliciul prin
complexare în astfel de metaboliți exo-celulari ar avea caracteristici benefice pentru plante
7 și prin aplicare directă.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este de a identifica și selecta
9 Consorții de microorganism care eliberează siliciul din matricea lignocelulozică, inclusiv prin
extragerea celui complexat de componentele respectivei matrice, și îl mențin în soluție ca
11 acid silicic, eventual complexat.

Termenul "acid silicic" se referă la un grup de specii moleculare alcătuite din atomi
13 de siliciu, hidrogen și oxigen. Acizii silicici simpli includ acidul metasilicic (H_2SiO_3), acidul
ortosilicic (H_4SiO_4), acidul disilicic ($H_2Si_2O_5$) și acidul piroxilic ($H_6Si_2O_7$), și reprezintă speciile
15 moleculare cu o solubilitate mai ridicată în soluțiile apoase. În anumite condiții, acești acizi
silicici condensează pentru a forma polimeri de acizi silicici, cu o structură complexă.
17 Produsul de polimerizare avansată ($SiO_2 \cdot nH_2O$) este denumit silicagel, în stare semnificativ
hidratată, silice amorfă, atunci când este parțial dehidratat, opal când procesul de
19 condensare și de deshidratare este avansat. Structurile formate în țesuturile plantelor prin
precipitarea și condensarea acidului silicic sunt denumite opal biogen, bioopal, fitolite
21 (**Belton et al. 2012, FEBS Journal, 279:, 1710-1720**).

Un alt scop al acestei invenții este de a prezenta un agent de gelifiere pentru mediul
23 de cultivare a izolatelor testate care să nu fie degradat de enzimele care acționează asupra
matricei celulare și care să permită o difuziune optimă a compușilor amfifili potențial formați
25 prin complexarea formelor de siliciu solubil.

Una din problemele tehnice în identificarea rapidă a izolatelor de microorganisme
27 care produc amestecuri de enzime cu activitate de degradare a materialului lignocelulozic,
glicozil-hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor și oxidaze care acționează asupra
29 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,
31 agaroză, gellanul, xanthanul. Gardner et al. (2012) (Biotechnology Letters, 34: 81-89) au
dezvoltat un procedeu de screening în care folosesc un mediu solidificat cu poli(acrilamidă
33 (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
35 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,**
37 **Journal of Hazardous Materials, 175: 327-330**), deci poli(acrilamidă nu este cel mai
convenabil agent de gelifiere al mediilor utilizate pentru screening izolatelor de
39 microorganisme cu capacitate ridicată de degradare a materialului lignocelulozic.

În vederea identificării și selecției consorțiilor de microorganism care eliberează și
41 solubilizează biosiliciul din material vegetal, până la etapa de evidențiere a eliberării speciilor
moleculare de siliciu conform procedurii descrise de prezenta invenție, se parcurg
43 următoarele faze:

1. Depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu a unui
45 mediu minimal sterilizat, cu o grosime de 8 mm, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic
micronizat, ca unică sursă de carbon și energie, și care este hidrogelificat cu un tribloc co-
47 polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri
hidrofile de polietilenglicol;

RO 131828 B1

2. Inocularea în condiții axenice a mediului minimal hidrogelifiat, cu 12 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și incubarea timp de 60...120 h, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme dezvoltate, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 12 în 12 h;	1 3
3. 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, într-o placă de microtitrare cu 96 godeuri, 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;	5 7 9
4. Incubarea timp de 60...120 h, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginilor, din 12 în 12 h.	11
Ulterior are loc evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa cu un singur godeu și în placa martor cu 96 godeuri și prelevarea imaginii plăcilor, urmată de 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 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 eliberarea de siliciu solubil.	13 15 17 19
Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:	21
- materialul lignocelulozic micronizat folosit ca sursă unică de carbon și energie în mediul minimal este reprezentat de pulbere micronizată de: tulpini de porumb, <i>Zea mays</i> , sau paie de grâu, <i>Triticum aestivum</i> , pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac;	23
- inocularea în condiții axenice a plăcii de testare și a plăcii martor se realizează prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini din oțel inox, a 10...20 μl de inocul lichid, cu circa 10 ⁶ ufc/ml, dintr-o placă cu 96 godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor/izolatelor de testat;	25 27
- evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa cu un singur godeu se face prin tratare cu 10 ml soluție molibdată de amoniu, (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 s, adăugare de 10 ml acid tartric 1,33 M după 10 min și de 10 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min și incubare timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii;	29 31 33
- evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa martor cu 96 godeuri se face prin tratare cu 0,1 ml soluție molibdată de amoniu, (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 s, adăugare de 0,1 ml acid tartric 1,33 M după 10 min și de 0,1 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min, și incubare timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii.	35 37
Invenția prezintă următoarele avantaje:	39
- realizarea concomitentă a screeningului pentru eliberarea speciilor de siliciu solubil din materialul vegetal și menținerea acestora în soluție și pentru interacția biologică cu alte tulpini/izolate, respectiv antagonism, neutralism, mutualism;	41
- asigurarea statistică a experimentelor datorită utilizării unor scheme de testare randomizată, compatibile cu modelele de analiză a varianței;	43
- posibilitatea evidențierii interacțiilor dintre microorganisme care se dezvoltă în structuri de tip biofilm, similare celor naturale, datorită mediului hidrogelifiat cu un tribloc copolimer; în structurile de tip biofilm, microorganismele prezintă rezistență sporită la factorii de mediu, inclusiv antagonism;	45 47

RO 131828 B1

1 - selectarea de tulpini care sunt utile atât pentru producerea de compuși utilizabili
2 pentru desilicierea materialului vegetal destinat biorafinării, cu generarea de inputuri
3 tehnologice conținând biosiliciu recuperat, cât și pentru tratamente în agricultură, ca
4 biostimulanți microbieni, în special pentru tratamentul resturilor vegetale de pe sol în
5 sistemele de agricultură conservativă.

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

7 Exemplul 1

8 Se prepară un mediu minimal M9 care conține la 1 l: Na_2HPO_4 (anhidru) 6 g; KH_2PO_4
9 3 g; NaCl 0,5 g; NH_4Cl 1 g, 10 g pulbere micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pretra-
10 tate prin expandarea fibrelor cu amoniac, și nouă microelemente, în următoarele concentrații
11 finale: MgSO_4 1 mM; CaCl_2 0,1 mM; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3×10^{-9} M; H_3BO_3 4×10^{-7} M;
12 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3×10^{-8} M; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-8} M; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8×10^{-8} M; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
13 1×10^{-8} M; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-6} M (reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). Se realizează
14 mai întâi mediul cu principalele săruri și pulberea micronizată de tulpini de porumb, și se
15 aduce pH-ul la 7,4 cu NaOH.

16 Mediul se hidrogelifiează prin depunerea unor pelete dintr-un tribloc co-polimer,
17 format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de
18 polietilenglicol (Poloxamer 407/Pluronic® F127, BASF AG, Ludwigshafen, Germania). Se
19 introduc 30 g de Poloxamer 407 în 70 ml mediu minimal M9, care conține numai
20 macronutrienți, și se lasă peste noapte la frigider pentru hidratare și omogenizare.
21 Poloxamerul 407 are proprietăți de gelifiere termoreversibile. Soluțiile de 30% Poloxamer 407
22 sunt lichide la temperaturi mai mici de 15°C și se solidifică la temperaturi mai mari de 15°C.
23 În mediul minimal gelifiat cu poloxamer, răcit la 4°C, se omogenizează 1 g de pulbere
24 micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pretratate prin expandarea fibrelor cu amoniac.
25 Mediul hidrogelifiat se sterilizează prin autoclavare, și apoi se adaugă micro-elementele, prin
26 diluarea unor soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare, adăugate în volumele necesare pentru
27 atingerea concentrației finale în mediul de cultură.

28 Într-o placă Cellstar® OneWell Plate™ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania),
29 se adaugă aseptice 63,2 ml de mediul minimal M9 - pulbere de tulpini de porumb - poloxamer,
30 lichifiat la 4°C, pentru a forma un strat de mediu de cultură cu grosime de 8 mm. Mediu se
31 lasă la temperatura camerei în condiții aseptice pentru a se încălzi și solidifica. Acest strat
32 de mediu de cultură hidrogelifiat cu poloxamer se inoculează axenic, cu 12 tulpini/izolate de
33 testat, distribuite randomizat în 8 repetiții. Inocularea se realizează cu mici cantități de inocul
34 lichid, prelevat cu ajutorul unui replicator de inox cu 96 pini (Multi - Blot™ Replicator System,
35 V&P Scientific, San Diego, CA, SUA), dintr-o placă cu 96 godeuri, în care s-a realizat axenic
36 în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor/izolatelor de testat, conform celor descrise
37 în continuare. Într-o placă cu 96 godeuri, se distribuie aseptice tampon fosfat salin steril, câte
38 225 μl în fiecare godeu. Culturi reîmprospătate din tulpinile de testat, realizate pe mediu
39 lichid decoct de cartof - glucoză, timp de 24 h în cazul procariotelor (bacterii, gram-negative
40 sau gram-pozitive, cianobacterii) și de 48 h în cazul altor microorganisme, se normalizează
41 prin diluție la 10^7 ufc/ml. Din aceste culturi se preiau 25 μl , care se aduc axenic peste cei
42 225 μl tampon fosfat salin steril, conform schemei de randomizare prezentate în tabelul de
43 mai jos:

RO 131828 B1

*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 μ l de inocul lichid, cu 10^6 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.

Placa inoculată se incubă timp de 60...120 h, la temperaturi 30°C. Din 12 în 12 h se preiau imaginile coloniilor de microorganisme, 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. Pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri cu fund plat (Corning® Costar® cell culture plates, Corning, NY, SUA), se distribuie câte 325 μ l de mediu minimal M9 - pulbere de tulpini de porumb - poloxamer, pentru a forma un strat cu grosime de 8 mm. Cele 12 tulpini/izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, conform tabelului, se inoculează cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, care a fost în prealabil sterilizat prin flambare.

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 și plăcile cu un singur godeu, în care microorganismele interacționează. Din 12 în 12 h, se preiau imaginile coloniilor de microorganisme dezvoltate în fiecare godeu, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene).

Speciile moleculare de siliciu solubil eliberate în placa cu un singur godeu și în placa martor cu 96 godeuri se evidențiază cu acid molibdenic. În placa cu un singur godeu se aplică 10 ml soluție molidat de amoniu, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,06 M în acid sulfuric 1 M. Se agită placa prin mișcare ușoară timp de 20 s și se incubă la temperatura camerei timp de 10 min. Se adaugă 10 ml acid tartric 1,33 M. Se incubă la temperatura camerei alte 10 min, după care se adaugă 10 ml soluție acid ascorbic 0,071 M. Se incubă în final timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii. Se preia imaginea plăcii, cu zonele corespunzătoare în care s-a dezvoltat colorația albastră specifică formării acidului silicomolibdenic.

RO 131828 B1

1 În placa martor cu 96 godeuri se distribuie câte 0,1 ml soluție molidat de amoniu,
2 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,06 M în acid sulfuric 1 M, în fiecare godeu. Se agită placa prin mișcare
3 ușoară timp de 20 s și se incubă la temperatura camerei timp de 10 min. Se adaugă 0,1 ml
4 acid tartric 1,33 M în fiecare godeu. Se incubă la temperatura camerei alte 10 min, după care
5 se adaugă 0,1 ml soluție acid ascorbic 0,071 M în fiecare godeu. Se incubă în final timp de
6 60 min la temperatura camerei și se preia imaginea plăcilor.

7 Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii se prelucrează cu ajutorul
8 softului specializat, open acces, Colonyzer (Lawless et al. 2010, BMC Bioinformatics, 11,
9 287). Se obțin date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office, Microsoft, Redmond,
10 WA, SUA), pentru dezvoltarea coloniilor și pentru formarea suprafeței colorate ca urmare a
11 reacției speciilor de siliciu eliberate din materialul lignocelulozic cu acidul molidenic. Se
12 compară suprafețele coloniilor și, respectiv, ale suprafețelor colorate, în proba cu 12
13 tulpini/izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție
14 reciprocă, în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină/izolat
15 de testat s-a dezvoltat separat. Se identifică, prin analiza variantei (ANOVA, StatSoft - Dell
16 Software, Tulsa, OK, SUA), microorganismele care interacționează reciproc, în dezvoltare,
17 ca antagonism sau stimulare, și, respectiv, în eliberarea de siliciu solubil din materialul
18 lignocelulozic.

19 **Exemplul 2**

20 Se procedează ca în exemplul 1, numai că se folosește pulbere micronizată de paie
21 de grâu, *Triticum aestivum*, pretratate prin expandarea fibrelor cu amoniac, ca unică sursă
22 de carbon și energie în mediul minimal hidrogelificat.

23 Această lucrare a fost realizată prin programul Parteneriate în domenii prioritare —
24 PN II, derulat cu sprijinul MEN - UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0846, contract
25 159/2014 CERES".

RO 131828 B1

Revendicare

1

Procedeu de selecție a consoțiilor de microorganism care eliberează și solubilizează biosiliciul din materialul vegetal, **caracterizat prin aceea că**, se evidențiază eliberarea speciilor moleculare de siliciu solubil astfel: în placa cu un singur godeu prin tratare cu 10 ml soluție molibdat de amoniu 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 s, urmată de adăugarea a 10 ml acid tartric 1,33 M după 10 min și de 10 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min, și incubarea timp de 60 min la temperatura camerei, respectiv în placa martor cu 96 godeuri prin tratare cu 0,1 ml soluție molibdat de amoniu 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 s, urmată de adăugarea a 0,1 ml acid tartric 1,33 M după 10 min și de 0,1 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min și incubarea timp de 60 min la temperatura camerei, până la apariția colorației albastre.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 453/2019