



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 01015**

(22) Data de depozit: **04/12/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2023** BOPI nr. **3/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2019 BOPI nr. **7/2019**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI
PETROCHIMIE - ICECHIM BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CORNEA PETRUȚA CĂLINA,
STR. MUȘAT CONSTANTIN NR. 1, BL. 16,
SC. 2, AP. 25, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **VOAIDEȘ CĂTĂLINA MIHAELA,
ALEEA CIOPLEA, NR.4, ET.1, AP.16,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **BOIU-SICUIA OANA ALINA,
STR.CHILIA VECHIE, NR.6, BL.A8, SC.1,
ET.1, AP.5, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU NR. 4,
BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JECU MARIA LUIZA, STR.PICTOR OCTAV
BANCILĂ, NR.8, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 131932 A2; US 8026086 B2;
CN 102260116 B**

(54) **CONSORȚIU MICROBIAN MULTIFUNCȚIONAL
PENTRU SOLUBILIZAREA FITOSILICIULUI, ȘI PROCEDEU
PENTRU UTILIZAREA ACESTUIA**



RO 133468 B1

1 Prezenta invenție se referă la un consorțiu multifuncțional de microorganisme, care
are capacitatea de a elibera nanoparticule de siliciu din materialul vegetal bogat în fitosiliciu,
3 facilitând separarea ulterioară a nanocelulozei și a compușilor fermentescibili, și care acțio-
nează ca un biostimulant microbial pentru plante, datorită compușilor pe care-i secretă în
5 rizosfera plantelor de cultură, ca și la un procedeu de utilizare a acestui consorțiu microbial
multifuncțional, având aplicații în domeniul biotehnologiilor vegetale.

7 Sunt cunoscute diferite procedee prin care se solubilizează fitosiliciul din materialul
vegetal, inclusiv procedee în care sunt implicate consorții microbiene. În materialul vegetal
9 fitosiliciul se regăsește sub două forme: complexat în hemicelulozele din matricea extra-
celulară (He et al. 2015. *New Phytologist*, 206: 1051-1062) sau precipitat în matricea
11 extracelulară (Epstein 1999, *Annual Review of Plant Biology*, 50: 641-664). Fitosiliciul
complică semnificativ utilizarea materialului vegetal în procesele de biorafinare (Le et al.
13 2015, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9: 109-121), astfel încât solubilizarea lui încă
din primele etape de biorafinare este utilă pentru o mai bună prelucrare a materialului vegetal
15 în (bio)produse chimice.

Documentul brevet CN 102260116 se referă la un procedeu de recuperare a fitosili-
17 ciului din pleavă de orz, care implică următoarele etape: amestecarea a 50-75% pleavă orz,
cu 0,5-1,5% consorțiu microbial și cu apă până la 100%; fermentarea semisolidă a
19 amestecului timp de 72 h; 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
21 obținerea extractului de fitosiliciu. Consorțiul microbial este alcătuit din *Bacillus subtilis*,
Bacillus laterosporus, și drojdie într-un raport în greutate de: 50 până la 80%, 0 până la 50%
23 și, respectiv, 0 până la 35%. Nu sunt revendicate tulpini specifice de microorganisme, selec-
tate pentru o activitate specifică destinată unei eliberări optime a fitosiliciului din materialul
25 vegetal. Procedeu de extracție a fitosiliciului implică utilizarea unei soluții alcaline, la
temperaturi ridicate. Brevetul nu descrie utilizarea ulterioară a materialului vegetal extras.

27 Cererea de brevet RO 131932 A1 se referă la un consorțiu de *Trichoderma* și bacterii
gram-pozitive endo-sporulante, cu activitate biostimulantă pentru plante, este constituit din
29 tulpinile de *Trichoderma asperelum* Td36b, NCAIM (P) F 001434, și tulpina de *Brevibacillus*
parabrevis B50, (P) B 001413, care, aplicate împreună, stimulează creșterea plantelor în
31 faza de plantulă și degradează resturile vegetale de grâu, cu eliberarea de fitosiliciu, deter-
minând creșterea concentrației de siliciu biodisponibil din soluția solului. Nu este descrisă
33 însă utilizarea consorțiului microbial pentru eliberarea fitosiliciului în cadrul unui proces de
biorafinare.

35 Documentul brevet 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,
37 care include următoarele etape: pre-tratarea materialului vegetal cu conținut ridicat de siliciu,
ca de exemplu: plante de coada-calului/din genul *Equisetum*, pentru a crea o materie primă
39 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
41 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
43 la silice sau alte forme de siliciu cu utilizări industriale. Agentul biologic utilizat poate fi
constituit din bacterii anaerobe termofile (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium*
45 *thermodydrosulfuricum* și *Thermoanaerobacter ethanolicus*), enzime (în special cu activitate
celulozolică, produse de exemplu de *Trichoderma reesei*), sau un amestec de enzime și
47 drojdii. Nici în cazul acestui brevet nu sunt revendicate tulpini specifice de microorganisme,

selectate pentru activitatea specifică ridicată, prin care să se realizeze eliberarea optimă a fitosiliciului din matricea lignocelulozică a materialului vegetal. Materialul vegetal rezultat după extragerea fitosiliciului este utilizat pentru biorafinare, dar fitosiliciul este utilizat pentru producere de carbură de siliciu sau tetraclorură de siliciu, și nu pentru obținerea de produse utilizabile ca inputuri în tehnologiile agricole.

Un procedeu prin care s-ar recupera fitosiliciul din materialul vegetal, care ar fi apoi utilizat pentru realizarea unor inputuri agricole ar contribui la reducerea impactului pe care actualul tip de economie agricolă îl are asupra solului (**Carey și Fulweiler, 2016, Functional Ecology, 30, 1331-1339**). În pofida abundenței sale în scoarța pământului, rezervorul de siliciu solubil biodisponibil pentru plante în sol este limitat, reciclarea fitosiliciului fiind esențială pentru asigurarea pe termen lung a fertilității solurilor (**Haynes, 2017, Agriculture, Ecosystems & Environment, 245, 100-111**). Siliciul solubil este un biostimulant pentru plante (**Savvas și Ntatsi, 2015, Scientia Horticulturae, 196, 66-81**), iar un nivel optim de siliciu solubil în sol este indispensabil pentru răspunsul adecvat al plantelor la factorii de stres biotici (**Wang et al., 2017, Frontiers in Plant Science, 8:701**) și abiotici (**Kim et al. 2017, Frontiers in Plant Science, 8:510**), amplificați de schimbările climatice. Exportul de siliciu din sol prin biomasa recoltată de plante cultivate, fără reciclarea fitosiliciului, determină reducerea rezervorului de siliciu solubil/biodisponibil (**Vandevenne, 2012, Frontiers in Ecology and the Environment, 10: 243-248**), iar preconizata utilizare pe scară largă în procesele de biorafinare a resturilor vegetale, în special a celor cu un conținut ridicat de biosiliciu, cum sunt paie de grâu sau tuleii de porumb, va accentua fenomenele de desiliciere a solurilor. Una din formele cele mai eficiente de administrare a siliciului este reprezentată de nanoparticulele de siliciu (**Luyckx et al. 2017, Frontiers in plant science, 8:411**).

Termenul de siliciu solubil se referă la "acidul silicic" care este solubil în soluția solului, la valorile normale de pH, cuprins între 3 și 10. Prin acid silicic se numesc un grup de specii moleculare alcătuite din atomi 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 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. Produsul de policondensare avansată ($SiO_2 \cdot nH_2O$) este denumit silicagel, în stare semnificativ hidratată, silice amorfă, atunci când este parțial dehidratat sau opal când procesul de condensare și de deshidratare este avansat. Structurile formate în țesuturile plantelor prin precipitarea și condensarea acidului silicic sunt denumite opal biogen, bioopal, fitolite. (**Belton et al. 2012, FEBS Journal, 279: 1710-1720**). Fitolitele sunt nanostructurate și au un semnificativ potențial pentru bionanotehnologie (**Neethirajan et al. 2009, Trends in Biotechnology, 27: 461-467**).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un consorțiu multifuncțional de microorganisme care eliberează siliciul din materialul vegetal bogat în fitosiliciu sub formă de nanoparticule, facilitând eliberarea ulterioară a nanocelulozei și a compușilor fermentescibili.

Este un obiect secundar al acestei invenții de a realiza un consorțiu multifuncțional care acționează ca un biostimulant microbial pentru plante, datorită compușilor pe care are capacitatea de a-i secreta în rizosfera plantelor de cultură.

Este un obiect secundar al acestei invenții de a dezvolta un procedeu de utilizare a consorțiului multifuncțional, pentru a asigura conversia materialului vegetal bogat în fito-siliciu în compuși cu valoare adăugată mare.

RO 133468 B1

1 Consoțiuul microbial multifuncțiuonal conform invenției este constituit din tulpinile de
2 *Trichoderma harzianum* Td50b, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) F 001412 la
3 National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din
4 Budapesta, Ungaria și tulpina de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32, depozitată cu numărul
5 de depozit NCAIM (P) B 001414 la National Collection of Agricultural and Industrial
6 Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, care, aplicate împreună, eliberează
7 siliciul din materialul vegetal bogat în fitosiliciu sub formă de nanoparticule, facilitând
8 eliberarea ulterioară a nanocelulozei și a compușilor fermentescibili și, de asemenea, atunci
9 când sunt aplicate ca tratament al rizosferei acționează ca un biostimulant microbial pentru
10 plante.

11 Procedeul de utilizare a consoțiuului constă în următoarele etape:

12 - cultivarea microorganismelor pe medii industriale, *Trichoderma harzianum* Td50b,
13 timp de 5 zile, și *Pseudoxanthomonas mexicana* P32, timp de 2 zile;

14 - separarea biomasei microbiene și amestecarea în proporție de 1 parte biomasă
15 umedă *T. harzianum* Td50b cu 2 părți biomasă umedă *P. mexicana* P32;

16 - amestecarea celor 3 părți biomasă de consoțiu microbial Td50b - P32 cu 47 părți
17 material vegetal bogat în siliciu și 450 părți mediu mineral minimal;

18 - incubarea timp de 3 zile la temperatura de 25°C și o rată de aerare de 1 L aer per
19 litru de mediu per min;

20 - separarea biomasei, material vegetal + consoțiu microbial, de mediul lichid prin
21 filtrare, recuperarea suspensiei de nanoparticule prin ultrafiltrare și concentrarea ei prin
22 evaporare sub vid;

23 - amestecarea biomasei separate, material vegetal + consoțiu microbial, cu mediu
24 mineral minimal, în proporție de 1 parte biomasă umedă la 9 părți mediu mineral minimal și
25 incubarea timp de 5 zile la temperatura de 35°C și aerare;

26 - separarea biomasei de mediu lichid prin centrifugare la 7500 xg, urmată de
27 recuperarea nanocelulozei prin ultrafiltrare pe o membrană ceramică cu limita de excludere
28 de 300 kD;

29 - concentrarea permeatului cu conținut de zaharuri fermentescibile până la 10% s.u.
30 și valorificarea prin fermentație industrială;

31 - amestecarea biomasei, material vegetal recalcitrant și biomasă de microorganisme
32 multifuncționale cu o suspensie conținând 10% făină, urmată de extrudarea pastei rezultate,
33 granularea pe un echipament de sferonizare, și uscare granule într-un uscător în pat fluidizat,
34 la o temperatură maximă de 42°C.

35 Materialul vegetal bogat în siliciu folosit în acest procedeu este selectat dintre
36 următoarele: pleavă de grâu spelta, borhot de la fabricarea berii, tărâțe de grâu, iarbă de
37 *Equisetum spp.*

38 Mediu mineral mediu minimal folosit are următoare compoziție: KH_2PO_4 1,0 g/l,
39 K_2HPO_4 1,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4NO_3 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, CaCl_2 20 mg/l și FeCl_3
40 $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/l.

41 Invenția prezintă următoarele avantaje:

42 - eliberează fitosiliciul sub formă de nanoparticule de silice, care au o ridicată
43 activitate de biostimulant pentru plante, datorită suprafeței ridicate de eliberare acid silicic;

44 - recuperează nanoceluloza alături de compușii fermentescibili;

45 - utilizează biomasa recalcitrantă ca suport de condiționare ca consoțiuului microbial
46 multifuncțiuonal, în vederea aplicării lui ca tratament al rizosferei plantelor de cultură.

47 În continuare se prezintă exemple de realizare a invenției, care o ilustrează fără a o
48 limita.

RO 133468 B1

Exemplul 1

Se realizează un consorțiu microbial multifuncțional amestecând 1 parte biomasă umedă *T. harzianum* Td50b cu 2 părți biomasă umedă *P. mexicana* P32. Biomasă umedă de *T. harzianum* Td50b se obține după cultivare pe mediu un mediu industrial pe bază de zer. În zerul dulce obținut de la fabricarea cașului de vacă se determină substanța uscată refractometric, se diluează până la 3% substanță uscată din zer cu apă deionizată și apoi s-au adăugat 1,5% borhot de porumb de la fabricarea etanolului (masă/volum); 0,5% KH_2PO_4 , (masă/volum); 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (masă/volum). Se distribuie câte 100 ml în flacoane erlenmeyer de 500 ml închise cu dop de vată, se sterilizează la 121°C timp de 25 min, după care se inoculează aseptice cu 5 ml de suspensie conținând 10^7 spori/ml și se incubă pentru 5 zile la 25°C pe masă rotativă, 150 rpm. Biomasă umedă de *T. harzianum* Td50b se separă prin centrifugare la 5,000 xg. Multiplicarea tulpinii *P. mexicana* P32 se realizează pe un mediu industrial pe bază de glicerină OK (brevet RO 118717), care conține 10 g/L glicerina, 1,5 g/L autolizat de drojdie, K_2HPO_4 1,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L. Mediu lichid este corectat la pH 6,5 cu NaOH 1 N, repartizat câte 150 ml în erlenmeyere de 1 L și agitat 150 rpm pe un agitator orbital la 28°C, 48 h. Biomasă umedă de *P. mexicana* P32 se separă prin centrifugare la 10,000 xg.

Încadrare taxonomică a tulpinii de *Trichoderma harzianum* Td50b este: Filumul *Ascomycota*, Clasa *Sordariomycetes*, Ordinul *Hypocreales*, Familia *Hypocreaceae*, genul *Trichoderma*. Caracteristicile morfologice sunt:

- dezvoltarea coloniei: 4,5-7,5(-9,0) cm diametru după 5 zile, pe mediul CGA, inițial ± hialină, ulterior albicioasă-verde cu zone de mănunchiuri de conidiofori albastru-verzi; reversul coloniei necolorat;

- conidiofori: ramificați piramidal, cu ramuri mai scurte spre apex;

- fialide: în grupuri de 2-4, destul de subțiri și adesea curbate, de (6)8-14(-20) X 2,4-3,0 μm;

- Conidii subgloboase sau elipsoidale, de 3,6-4,5 μm în diametru cu pereții aspri;

- clamidospori prezenți în miceliul culturilor mai vârstnice, intercalări și uneori terminali, cel mai adesea globoși, hialini, cu pereții netezi.

Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi, sunt:

- surse de carbon: optime: manita, fructoza, riboza, glucoza (dextroza), galactoza, manoza; dezvoltare fungală moderată pe: arabinoză, sorboză, melibioză, maltoză, lactoză, celobioză, celuloză, amidon, inulină; dezvoltare fungală slabă pe: sorbitol, xiloză, zaharoză (sucroză), glicerol;

- surse de azot: optime: DL-leucină, L-cistină, DL-citrulină, DL-nor-leucină, azotatul de amoniu, tartratul de amoniu; dezvoltare fungală moderată pe: L-arginină, L-leucină, glicocol, asparagină, riboflavină, sulfat de amoniu, carbonat de amoniu, fosfat monobazic; dezvoltare fungală slabă pe: triptofan, tirozină, D-serină, lizină, uree, azotați de sodiu, calciu și potasiu.

Caracteristici fizice de creștere și sporulate sunt:

- temperatura: temperatura optimă: 20-25°C; temperatura minimă: 2°C; temperatură maximă: 37°C;

- reacția substratului de cultură: pH optim: 4,0-5,5; dezvoltare slabă a ciupercii la valori de pH de la 9,0 la 13,0.

Identificarea realizată pe criterii morfologice a fost confirmată de analiza moleculară a ITS1 a clusterului pentru gena rRNA (marker universal fungal BarCode, <http://www.isth.info>). S-au folosit primerii specifici ITS1 SR6R f și LR1 r (conform protocol BarCode <http://www.isth.info/methods>). Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda Dye Terminator Cycle Sequencing, folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer. Waltham, MA, SUA). Compararea secvențelor s-a realizat cu programul TrichoBlast (<http://www.isth.info/tools/blast/index.php>).

RO 133468 B1

1 Pentru încadrarea taxonomică a tulpinii P32 s-a folosit o abordare polifazică, tulpina
fiind caracterizată din punct de vedere morfologic (tabelul 1), biochimic și fiziologic
3 (tabelul 2), al compoziției de acizi grași celulari și al secvenței parțiale 16S rADN.

5 *Morfologia coloniilor și celulelor de Pseudoxanthomonas mexicana P32 pe mediu LB*
agarizat după cultivare timp de 24 h

Tabelul 1

Caractere morfologice specifice pentru <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> P32	
Colonia	forma: circulară
	aspectul suprafeței: netedă, convexă
	transparență: translucidă
	culoarea: gălbui pal până la bej
Celule:	forma: bastonaș
	dimensiuni: 0,7-0,8 x 1,5-2,5 μm
	aranjament flagelar: un singur flagel polar

19 *Caracteristicile fiziologice ale tulpinii P32*

Tabelul 2

Testul biochimic	P32
Reacția Gram	-
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Urează	-
Reducerea NO ₃ → NO ₂	-
Creștere anaeroba	-
Oxidază	+
Catalaza	+
Sursa de carbon:	
genobioză	-
galactoză	-
zaharoza	+
maltoza	-
glucoza	-
xiloza	+
manoză	+
fructoză	-
trehaloză	-
sorbitol	+
manitol	+
inozitol	-
glicerol	+
meso-eritritol	+

RO 133468 B1

Compoziția în acizi grași celulari fost determinată folosind un sistem automat GC 1
Sherlock Microbial Identification System (MIDI, Newark, SUA) și procedura standard MIDI 3
(**Sasser, 1990, în Methods in Phytobacteriology, pp. 119-204. Z. Klement, K. Rudolph și D. C. Sands eds., Budapest: Akademiai Kiado**). Acizi grași celulari predominanți sunt, 5
în ordinea descreșterii abundenței: 15: 0 iso, 17: 1 iso cis7, 16: 0 iso, 11: 0 iso 3-OH și 11: 7
0 iso, corespunzând profilului de acizi grași celulari specific speciei *Pseudoxanthomonas mexicana* (Thierry et al., 2004. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2245-2255).

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin aplicarea unui protocol de 9
lucru caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure - colonii izolate, tehnica 11
însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului bacterian; electroforeză în gel pentru 13
detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 16S rADN prin tehnica PCR și electroforeză în 15
gel; purificarea ADN-ului ribozomal; precipitarea și uscarea ADN-ului ribozomal. 17
Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda *Dye Terminator Cycle Sequencing* 19
(Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). 21
Secvențele au fost analizate folosind programul CHROMAS 2.33 (Technelysium Pty Ltd). 23
Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene NCBI 25
(National Center for Biotechnology Information), s-a realizat cu ajutorul programului BLAST 27
(Basic Local Alignment Search Tool). Secvența parțială de 527 perechi baze a prezentat o 29
similaritate de 100% cu secvența tulpinii de referință AMX 26B^T/ATCC 700993T (**Thierry et al., 2004. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2245-2255**).

Tulpina Td50b de *T. harzianum* este producătoare de celuloze, cerato-platanine și 21
6-pentil- α -pironă (6-PP). Cerato-plataninele sunt proteine necatalitice care desfac legăturile 23
de hidrogen din structura materialului lignogelulozic (Baccelli, 2015, Frontiers in plant 25
science, 5,769). Capacitatea tulpinii Td50b de a produce și acumula 6-pentil- α -pironă (6-PP) 27
a fost comparată cu a unei tulpini tip *Trichoderma atroviride* ATCC 74058, tulpină pentru care 29
s-a pus în evidență producerea de 6-PP (Reithner et al., 2005, Fungal Genet. Biol., 42:749- 31
760). Cele două tulpini au fost cultivate pe mediu lichid cartof-glucoză, în condiții staționare, 33
fără agitare, timp de 5 zile, la 25°C. După 5 zile miceliul format a fost omogenizat cu mediul 35
de cultură cu un blender de laborator (Waring®, Laboratory Blender, Fischer Scientific, 37
Waltham, MA, SUA). Cantitatea de biomasă din omogenat a fost determinată gravimetric, 39
după filtrare pe hârtie Whatman nr. 1 și uscare la 110°C până la masă constantă. S-au luat 41
25 ml de omogenat biomasă - mediu de cultură, care au fost extrași cu câte 25 ml de clorură 43
de metilen. Frațiile inferioare, conținând solventul cu densitate mai mare decât cea a apei, 45
s-au reunit, au fost uscate pe sulfat de sodiu anhidru, concentrate la sec și reluate în 0,1 ml 47
clorură de metilen. Determinarea 6-PP a fost făcută gaz-cromatografic, cu detector 1
spectrometru de masă. S-a folosit un gaz-cromatograf Agilent 700, echipat cu spectrometru 2
de masă quadropol (Agilent, Santa Clara, CA, SUA). 6-PP a fost separată pe o coloană DB-5 3
(diametru interior 0,32 mm, lungime 30 m, grosimea filmului 0,25 μ m). S-a aplicat 1 μ l de 4
probă în modul split, cu un raport de spliare de 1:100 până la sfârșitul perioadei de separare. 5
Coloană a fost menținută la 40°C pentru 2 min, urmată de o creștere de 20°C/min până la 6
120°C, care a fost menținută pentru 2 min, și apoi la 210°C cu 10°C/min. Temperatura 7
detectorului și a injectorului a fost de 250°C. S-a folosit heliul ca gaz purtător, cu un debit de 8
1,2 ml/min. Pentru cuantificare s-a realizat o curbă etalon folosind 6-PP pură (Sigma-Aldrich). 9
Cantitatea determinată de 6-PP a fost raportată la volumul de mediu de cultură și la canti- 10
tatea de biomasă uscată determinată gravimetric din respectivul mediu de cultură. S-a lucrat 11
în triplicat. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3, ca medii ale celor trei repetiții, comparativ 12
cu date raportate pentru alte tulpini de *Trichoderma* cultivate pe medii lichide. Aceste 13
rezultate susțin capacitatea tulpinii Td50b de a sintetiza cantități semnificative de 6-PP. 14

RO 133468 B1

Randamentul de sinteză al 6-pentil- α -pironei de către tulpinile testate, comparativ cu cel raportat pentru alte tulpini cultivate pe medii lichide

Tabelul 3

Tulpina	Condiții de creștere	Concentrația finală	Referința
<i>T. harzianum</i> Td50b	Mediu cartof-glucoză, 25°C, 5 zile	350 mg/L 83,41 mg/h	Prezentul exemplu
<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	Mediu cartof-glucoză, 25°C, 5 zile	238 mg/L 65,75 mg/g	Prezentul exemplu
<i>T. harzianum</i> IMI 206040	Mediu extract de malț - glucoza, 29°C, 5 zile	182 mg/L 60,67 mg/g	Serrano-Carrebn et al., 2004 ¹
<i>T. harzianum</i> , Indian străin	Mediu cartof-glucoză, 30°C, 5 zile	455 mg/L 98,91 mg/g	Kalyani et al., 2000 ²
<i>T. konigii</i> 7a, IMI 308475	Mediu cartof-glucoză, 20°C, 7 zile	145	Simon et al., 1988 ³

¹ - Serrano-Carrebn et al., 2004, Biotechnol. Lett, 26:1403-1406

² - Kalyani et al., 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:610-612

³ - Simon et al., 1988, Soil Biol. Biochem., 20:263-264

Activitatea celulazică și cea de producere a cerato-platinelor a fost pusă în evidență prin folosirea metodelor uzuale (celulaze - Fapyane și Ferapontova, 2017, Analytical Chemistry, 89: 3959-3965; cerato-platanine - Gomes, et al. 2015, Scientific Reports, 5:17998).

Tulpina P32 de *P. mexicana* este producătoare de hemicelulaze, feruol-esteraze și compuși cu rol de biostimulare a plantelor. Producerea de compuși volatili cu rol în fitostimulare a fost demonstrată prin determinarea producerii de acetoină. Acetoina (3-hidroxi-2-butanona, HB) este un metabolit fiziologic important excretat de microorganisme atunci când sunt crescute într-un mediu de cultură conținând glucoza sau alte surse de carbon degradabile pe calea Embden - Meyerhof. Formarea acetoină este pusă în evidență prin reacția Voges-Proskauer și servește drept marker în clasificarea microbiană având un rol important în reglarea ratei NAD/NADH și în stocarea carbonului. Producerea de acetoină demonstrează și capacitatea respectivelor tulpini de a produce 2,3-butandiol, 2,3-BD, compus volatil cu rol în stimularea creșterii plantelor (Ryu et al., 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:4927-4932). Tulpina P32 a fost crescută 24 h în LB (incubată la 28°C cu agitare), apoi 100 μ l cultură au fost inoculați în 5 ml mediu lichid cu glucoza (protezo - peptonă 7 g, glucoza 5 g, NaCl 5 g, apă distilată până la 1000 ml), distribuit în eprubete, sterilizat 15 min la 1 atm. Cultura a fost preparată în 3 repetiții și testată pentru producerea de acetoină la 3, 5 și 7 zile după inoculare și incubare la 28°C. Ca reactiv, s-a utilizat o soluție 10% NaOH, câte 1 ml distribuit în fiecare eprubetă și, ulterior, adăugarea în fiecare eprubetă a 1 mg de creatină, mixtura fiind agitată viguros. Apariția culorii roșii, după 30-60 min, la temperatura camerei, a indicat prezența acetil-metil-carbinolului, deci o reacție pozitivă, ceea ce arată capacitatea bacteriilor P32 de a produce compuși volatili care stimulează creșterea plantelor.

Într-o altă serie de experiment s-a testat capacitatea bacteriilor P32 de a solubiliza fosforul din compușii săi insolubili. Pentru determinarea capacității de solubilizare a fosforului mineral s-a utilizat mediul agarizat Pikovskaya, care conține (per litru): 0,5 g extract drojdie, 10 g glucoza, 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g KCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 15 g agar. Pe acest mediu bacteriile tulpinii P32 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat fosforul mineral.

RO 133468 B1

Capacitatea de a solubiliza fosforul organic s-a testat pe mediul PSM (phytate screening medium), care conține (per litru): 10 g glucoză, 4 g fitat de sodiu, 2 g CaCl₂, 5 g NH₄NO₃, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,01 g FeSO₄ · 7H₂O, 0,01 g MnSO₄ · H₂O, 15 g agar. Si pe acest mediu bacteriile tulpinii P32 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat și fosforul organic din fitați.

Activitatea hemicelulazelor și feruoilesterazică a fost pusă în evidență prin folosirea metodelor uzuale (**hemicelulaze - Houfani et al. 2017, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33: 29; feruoil-esteraze - Mastihuba et al. 2002, Analytical Biochemistry, 309: 96-101**).

Datorită prezenței proteinelor/enzimelor implicate în degradare a materialului vegetal (cerato-platanine, celulaze, hemicelulaze, feruoil-esteraze) consorțiul *T. harzianum* Td50b - *P. mexicana* P32 eliberează siliciu din materialul vegetal bogat în fitosiliciu sub formă de nanoparticule, și are capacitatea de a genera ulterior, din materialul de-silicificat, nanoceluloză și compuși fermentescibili. Datorită producerii de compuși volatili (6-PP, 2,3-BD) cu rol de stimulare a plantelor și de compuși care stimulează solubilizarea fosforului, consorțiul *T. harzianum* Td50b - *P. mexicana* P32 acționează ca un biostimulant microbial pentru plante, atunci când este aplicat ca tratament al rizosferei.

Într-un bioreactor de 3 L se aduc 12 g de biomasă de consorțiu microbial Td50b - P32 și se amestecă cu 188 g pleavă de grâu spelta, material vegetal bogat în siliciu și 1800 g mediu mineral minimal cu următoarea compoziție: KH₂PO₄ 1,0 g/L, K₂HPO₄ 1,0 g/l, NaCl 0,5 g/L, NH₄NO₃ 1,0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g/L, CaCl₂ 20 mg/L și FeCl₃ · 6H₂O 5 mg/L. Se incubă timp de 3 zile la temperatura de 25°C și o rată de aerare de 1 L de aer per litru de mediu per min. Se separă biomasă, material vegetal + consorțiu microbial, de mediul lichid prin filtrare pe filtru de presiune la 0,6 Mpa. Suspensia de nanoparticule de silice (bio-opal, SiO₂ · nH₂O), se separă din filtrat prin ultrafiltrare tangențială pe o membrană de 0,2 μm. Suspensia de nanoparticule de silice/bioopal se concentrează prin evaporare sub vid.

Biomasa separată, material vegetal + consorțiu microbial se resuspendă într-un bioreactor minimum 5 L utili, cu un mediu mineral minimal, în proporție de 1 parte biomasă umedă la 9 părți mediu mineral minimal. Se incubă timp de 5 zile la temperatura de 35°C și aerare cu 1 L de aer per min per litru de mediu. Se separă biomasă de mediu lichid prin centrifugare la 7500 xg. Din supernatant se recuperează nanoceluloza prin ultrafiltrare pe o membrană ceramică cu limita de excludere de 300 kD. Permeatul cu conținut de zaharuri fermentescibile se concentrează până la 10% s.u., și se valorifică prin fermentație industrială, cu drojdii pentru producerea de bioetanol, sau cu bacterii lactice, pentru producerea de acid lactic.

Biomasa separată prin centrifugare, material vegetal recalcitrant și biomasă de microorganisme multifuncționale, se reia cu o suspensie conținând 10% făină, iar pasta rezultată se extrudează printr-o mașină de paste. Pastele rezultate se taie tăiței, iar tăiței se granulează pe un echipament de sferonizare. Granule rezultate se usucă într-un uscător în pat fluidizat, la o temperatură maximă de 42°C.

Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul 1, numai că materialul vegetal utilizat este borhot de la fabricarea berii.

Exemplul 3

Se procedează ca în exemplul 1, numai că materialul vegetal utilizat este reprezentat de tărâțe de grâu.

Exemplul 4

Se procedează ca în exemplul 1, numai că materialul vegetal utilizat este iarba de *Equisetum spp.*

Revendicări

1. Consorțiul microbial multifuncțional conform invenției, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din tulpinile de *Trichoderma harzianum* Td50b, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) F 001412 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, Ungaria și de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) B 001414 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, care, aplicate împreună, eliberează siliciul din materialul vegetal bogat în fitosiliciu sub formă de nanoparticule, facilitând eliberarea ulterioară de către ele a nanocelulozei și a compușilor fermentescibili din materialul de-silicifiat și, de asemenea, atunci când sunt aplicate ca tratament al rizosferei acționează ca un biostimulant microbial pentru plante.

2. Procedeu de utilizare a consorțiului multifuncțional conform invenției, **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit din următoarele etape: cultivarea microorganismelor pe medii industriale, *Trichoderma harzianum* Td50b, timp de 5 zile, și *Pseudoxanthomonas mexicana* P32, timp de 2 zile; separarea biomasei microbiene și amestecarea în proporție de 1 parte biomasă umedă *T. harzianum* Td50b cu 2 părți biomasă umedă *P. mexicana* P32; amestecarea celor 3 părți biomasă de consorțiu microbial Td50b - P32 cu 47 părți material vegetal bogat în siliciu și 450 părți mediu mineral minimal; incubarea timp de 3 zile la temperatura de 25°C și o rată de aerare de 1 L aer per litru de mediu per min; separarea biomasei, material vegetal + consorțiu microbial, de mediul lichid prin filtrare, recuperarea suspensiei de nanoparticule prin ultrafiltrare și concentrarea ei prin evaporare sub vid; amestecarea biomasei separate, material vegetal + consorțiu microbial, cu mediu mineral minimal, în proporție de 1 parte biomasă umedă la 9 părți mediu mineral minimal și incubarea timp de 5 zile la temperatura de 35°C și aerare; separarea biomasei de mediu lichid prin centrifugare la 7500 xg, urmată de recuperarea nanocelulozei prin ultrafiltrare pe o membrană ceramică cu limita de excludere de 300 kD; concentrarea permeatului cu conținut de zaharuri fermentescibile până la 10% s.u. și valorificarea prin fermentație industrială; amestecarea biomasei, material vegetal recalcitrant și biomasă de microorganisme multifuncționale cu o suspensie conținând 10% făină urmată de extrudarea pastei rezultate, granulara pe un echipament de sferonizare, și uscarea granule într-un uscător în pat fluidizat, la o temperatură maximă de 42°C.

3. Procedeu de utilizare a consorțiului multifuncțional conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, materialul vegetal bogat în siliciu folosit în acest procedeu este selectat dintre următoarele: pleavă de grâu spelta, borhot de la fabricarea berii, tărâțe de grâu, iarbă de *Equisetum spp.*

4. Procedeu de utilizare a consorțiului multifuncțional conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că**, Mediul mineral mediu minimal folosit are următoarea compoziție: KH_2PO_4 1,0 g/l, K_2HPO_4 1,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4NO_3 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, CaCl_2 20 mg/l și $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/l.

