



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00616

(22) Data de depozit: 28/08/2018

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. 3/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI
PETROCHIMIE - ICECHIM BUCUREȘTI,
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;

• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CĂLIN MARIANA,
STR. CETATEA DE BALTĂ NR. 41, BL. 07A,
SC. 2, ET. 6, AP. 91, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A SUSPENSIILOR STABILE
DE NANOPARTICULE DE SELENIU ȘI SILICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor suspensii stabile de nanoparticule de seleniu elementar și silice asociate, destinate aplicării ca biostimulanți pentru plante. Procedeu conform invenției constă în etapele de cultivare a tulpinilor de microorganisme din familia *Hypocreaceae*, pe medii de cultură care favorizează exprimarea de proteine amfifile cu afinitate pentru carbohidrați, separarea miceliului de microorganisme de supernatant, umectarea și sterilizarea materialului vegetal cu conținut de siliciu, peste care se adaugă miceliul umed de microorganisme, un mediu

mineral minimal steril, prepararea unei soluții proteice prin purificarea proteinelor amfifile din supernatant, incubarea amestecului miceliu-material vegetal-soluție proteică, îndepărtarea miceliului și a materialului vegetal, rezultând un supernatant la care se adaugă septic o soluție de selenit de sodiu 10 mM, incubarea amestecului și concentrarea suspensiei de nanoparticule rezultată ca permeat prin ultrafiltrare, și apoi sterilizarea acesteia.

Revendicări: 5



45

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARC
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2018 00616
Data depozit ..28..08..2018....

PROCEDEU DE OBTINERE A SUSPENSIILOR STABILE DE NANOPARTICULE DE SELENIU ȘI SILICE ASOCIATE

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a suspensiilor stabile de nanoparticule de seleniu zerovalent și silice, asociate, destinate aplicării ca biostimulanți pentru plante, pentru mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici, pentru amplificarea preluării și utilizării nutrienților și pentru creșterea calității recoltei.

Sunt cunoscute procedee pentru sinteza suspensiilor stabile de nanoparticule de seleniu și silice asociate. Astfel de suspensii de nanoparticule au utilizări diverse. Atât nanoparticulele de seleniu elementar (zerovalent), cât și nanoparticulele de silice (bioxid de siliciu, mai ales hidratat, $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), datorită raportului lor ridicat suprafață/volum funcționează ca rezervor de eliberare treptată a speciilor chimice bioactive, ioni de seleniură, selenit și/sau selenat (Skalickova et al. 2017, *Nutrition*, 33: 83-90), respectiv acid ortosilicic (Quignard et al. 2017, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155: 530-537). Astfel de specii de seleniu și de siliciu bioactive acționează asupra plantelor de cultură ca biostimulanți anorganici (du Jardin, 2015, *Scientia Horticulturae*, 196: 3-14).

Siliciul nu este considerat deocamdată ca un element esențial pentru plante, ci doar ca unul cu efecte benefice (Yan et al 2018, *Journal of Integrative Agriculture*, 17:60345-7). Studiile au arătat că siliciul are toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (Savvas și Ntatsi, 2015, *Scientia Horticulturae*, 196: 66-81). Siliciul solubil este unul dintre pușinii elicitori care amorsează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din plante (Van Bockhaven et al. 2013, *Journal of Experimental Botany*, 64: 1281-1293). Acțiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în apărarea plantelor față de atacul patogenilor și al dăunătorilor, dar are efecte și de creștere a eficienței de utilizare a nutrienților, reducere a toxicității elementelor potențial toxice / metalelor grele, limitare a efectelor stresului hidric (salinitate, secetă) și a stresului termic (îngheț, temperatură crescută) (Frew et al. 2018, *Annals of botany*, 121: 1265–1273).

Siliciul cel mai accesibil pentru plante este cel de origine biologică, în special din material vegetal. Din astfel de bio-structuri eliberarea speciilor de siliciu solubil nu este însoțită și de eliberarea de contraioni, cum sunt cei de aluminiu, fier, calciu sau potasiu.

În cazul rocilor silicioase sau al amendamentelor silicioase, ca este de exemplu zgura silicioasă de furnal, elementele adiționale prezente, respectiv fierul (Fe) sau

alumiul (Al), reduc biodisponibilitatea siliciului. Acidul silicic, care este o specie moleculară parțial mobilă în soluția solului, este precipitat sub formă de argile secundare în contact cu ionii imobili (în sol) Fe^{3+} și Al^{3+} (Sommer et al. 2006, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 310-329).

Sărurile acidului silicic generează prin hidroliză un pH foarte ridicat, acidul silicic fiind un acid foarte slab. pH-ul ridicat al acestor săruri îngreunează aplicarea. De asemenea sărurile acidului ortosilicic sunt eficiente numai pe termen scurt și au dezavantajul de a genera prin solubilizare concentrații prea ridicate de acid ortosilicic în soluția solului, la limita de concentrație de 2 mM, la care siliciul solubil este preluat de către rădăcini (Tubana et al. 2016. *Soil Science*, 181: 393-411). La această limită de concentrație se generează și reacții de poli/oligo-condensare, cu formare de specii moleculare de siliciu care nu mai sunt biodisponibile (Spinde et al. 2011, *Chemistry of Materials*, 23: 4676-4687).

Comparativ cu alte forme de siliciu, nanoparticulele de silice sunt mai eficiente ca biostimulanți pentru plante, în special în cazul aplicării foliare (Laane, 2018, *Plants*, 7: 45). Se cunosc o serie de procedee destinate obținerii de nanoparticule de siliciu biogene. Brevetul US9403688B1 prezintă un procedeu de obținere a nanoparticulelor de silice biogene, care include următoarele etape: pre-tratamentul cojilor de semințe cu acid, plasarea cojilor tratate cu acid într-o autoclavă la o temperatură mai mare de 100°C, timp de aproximativ 2 ore, sub presiune, separarea cojilor de semințe și spălarea cu apă, uscarea la aer a cojilor de semințe, urmată de calcinarea cojilor la o temperatură cuprinsă între 500 - 700°C, timp de cel puțin o oră, pentru a produce nanoparticule de silice biogene. Nanoparticulele biogene de silice astfel obținute sunt amorfe și biocompatibile, având o dimensiune a particulelor cuprinsă în intervalul de 25-75 nm.

Cererea de brevet WO2017042011 se referă la un procedeu pentru extracția silicei din material vegetal lignocelulozic, care cuprinde etapele de: a) fracționarea materiei vegetale lignocelulozice în prezența unei soluții de acid, astfel încât să se obțină o fracție solidă cuprinzând celuloza, b) extragerea silicei din fracția solidă obținută în etapa a) cu o soluție bazică, la un pH între 10 și 13, și la o temperatură cuprinsă între 70 și 90°C, astfel încât să se obțină o fază lichidă conținând silice și o fază solidă, c) separarea fazei lichide și a fazei solide care se obține în etapa b), d) precipitarea silicei care este cuprinsă în faza lichidă, la un pH cuprins între 5 și 6.

Procedeele de mai sus sunt procedee chimice și au dezavantajul unor consumuri ridicate de acizi și baze, a căror producție și utilizare are impact asupra mediului. Procedeele biotehnologice, "verzi", cu o eco-eficiență ridicată, ar fi mai utile în producerea de nanoparticule de silice biogene.

A fost publicat un procedeu biologic de conversie a unor substraturi vegetale cu un conținut ridicat de structuri de silice formate în peretele celular (pleavă de orez) în nanoparticule de siliciu (Zielonka et al. 2018, *Fungal biology*, 122: 333-344). Tulpina folosită, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, este însă o tulpină etalon în ceea ce privește producerea de aflatoxine (Rasooli și Abyaneh, 2004, *Food control*, 15: 479-483), și deci acest procedeu are numai o semnificație teoretică, de demonstrare a posibilității conversiei biologice, și nu este utilizabil în practică.

Seleniul stimulează creșterea plantelor (Hartikainen și Xue, 1999, *Journal of Environmental Quality*, 28: 1372-1375; Xue et al. 2001, *Plant and Soil*, 237: 55-61), are rol în protecția plantelor față de agenții fitopatogeni (Hanson et al. 2003, *New Phytologist*, 159: 461-469), și față de factorii de stres abiotici, inclusiv metale grele (Feng et al. 2013, *Environmental and Experimental Botany* 87: 58-68) și secetă (Ahmad et al. 2016, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 372-380).

Pentru tratamentul plantelor sunt utilizați compuși anorganici de seleniu. Speciile anorganice de seleniu au o toxicitate care scade în ordinea selenat, > selenit, seleniură, seleniul elementar / zerovalent (Nuttall, 2006, *Annals of Clinical & Laboratory Science* 36: 409-420). În timp ce selenatul are o toxicitate foarte ridicată pentru șobolan, mai ridicată decât cea a cianurii de potasiu, seleniul zerovalent are o toxicitate cu două ordine de mărime mai redusă (Olson, 1986, *Journal of the American College of Toxicology* 5: 45-70). Nanoparticulele de seleniu zerovalent (SeNPs) au dovedit o toxicitate chiar mai redusă decât cea a seleniului elementar (Shakibaie et al. 2013, *Pharmaceutical Biology* 51: 58-63). În același timp, eficacitatea nanoparticulelor de seleniu (SeNPs) în inducerea seleno-enzimelor este comparabilă cu cea a celei mai eficiente forme de seleniu organic, seleno-metil-seleno-cisteină (SeMeSeCys) (Zhang et al. 2008, *Toxicological Sciences* 101: 22-31), compus cu toxicitate similară cu a selenatului și care se obține prin sinteze organice dificile, cu randament mic (Iwaoka et al. 2016, *Proceedings of the National Academy of Sciences, Section A*. 86: 499-509).

Producerea chimică a nanoparticulelor de seleniu implică utilizarea acizilor minerali concentrați (Stroyuk et al. 2008, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 320: 169-174) sau a unor reactivi toxici precum hidrazina (Mishra et al. 2005, *The Journal of Physical Chemistry B* 109: 12718-12723) sau lichidele ionice (Langi et al. 2010, *Materials Research Bulletin* 45: 668-671).

În schimb, biosinteza nanoparticulelor de seleniu se desfășoară în condiții blânde (Wadhvani et al. 2016, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 2555-2566). În general, SeNPs sintetizate biologic sunt cu până la de zece ori mai puțin toxice decât nanoparticulele sintetizate chimic (Mal et al. 2017, *Nanotoxicology* 11: 87-97).

Obținerea de nanoparticulele de seleniu prin biosinteză prezintă avantaje evidente. Cererea de brevet CN 107881127 (A) dezvăluie o tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens*, Lxz-41, depusă cu numărul M2016578 la China Center for Type Culture Collection (CCTCC), și o metodă de preparare controlabilă a nano-seleniului prin intermediul respectivei tulpini. Procedul de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu implică următoarele etape: cultivarea pe un mediu pe bază de glucoză și peptonă care conține și un surfactant, adăugarea unei sări de seleniu, de la început sau prin alimentare continuă, recoltarea culturii, ultrasonicarea bacteriilor și separarea endo-nanoparticulelor din interiorul celulelor bacteriene. Cererea de brevet CN105199979 (A) dezvăluie o tulpină de *Bacillus thuringiensis* YLX-4, izolată din apele de percolare de la o mină de seleniu (Enshi, provincia Hubei din China), depusă cu numărul M2013674 la China Center for Type Culture Collection (CCTCC). Tulpina are caracteristicile tipice ale seleno-bacteriilor și este utilizată inclusiv pentru producerea de nano-seleniu.

Aplicarea concomitentă la plante a seleniului și a siliciului determină efecte sinergice în protecția față de stresurile abiotice determinate de secetă (Emam et al. 2014, *Australian Journal of Crop Science* 8: 596), salinitate (Sattar et al. 2017, *Russian journal of plant physiology* 64: 341-348) și metale grele (Gao et al. 2018, *Science of The Total Environment*, 631: 1100-1108).

Pentru a valorifica acest sinergism dintre seleniu și siliciu, brevetul US 9,919,978B2 descrie un nanosol de silice în care este dopat nano-seleniu, obținut prin reducerea acidului selenios și/sau a sărurilor sale cu acid ascorbic, cu glutation sau cu glucide reducătoare. Nanoparticulele de seleniu hidrofob de maxim 50 nm sunt menținute în nanosolul de silice prin emulsifiere cu polivinilpirolidonă, alcool polivinilic,

sau monolaurat de polioxietilen - sorbitan (Tween 20). Produsul rezultat reduce absorbția cadmiului de către plantele de orez și concomitent, biofortifică agronomic cultura de orez cu seleniu.

Procedeul de preparare al unui nanosol de silice în care este dopat nano-seleniu dezvăluit în brevetul US 9,919,978B2 implică șapte etape în care se utilizează acizi și baze tari, inclusiv soluții toxice de amoniac. Dezavantajul acestui produs care asociază nanoparticule de seleniu și siliciu este comun cu al altor nanoparticule sintetizate chimic. Astfel de nanoparticule sintetizate chimic au o reproductibilitate redusă a acțiunii biologice, pentru că își formează aleatoriu o biocoroană variabilă de proteine și/sau alte biomolecule, la interacția cu sistemele biologice (Guerrini, 2018, *Materials*, 11: 1154), iar efectele asupra plantelor sunt semnificativ mediate de această biocoroană (Ma et al. 2018, *Annual review of food science and technology* 9: 129-153). Controlul asupra biocoroanei nanoparticulelor este esențial pentru activitatea biologică a acestora (Ke et al. 2017, *ACS nano* 11: 11773-11776).

Nanoparticulele produse prin biosinteză / sinteză bioasistată în medii biologice, au avantajul de a-și forma o coroană cu stabilitate mai ridicată încă din faza de (bio)sinteză. Acest tip de coroană, formată încă din faza de biosinteză / sinteză bioasistată amplifică proprietățile nanoparticulelor - de exemplu nano-seleniu sintetizat bioasistat în mediul de cultură al fungilor din genul *Trichoderma* are o acțiune amplificată de combatere a făinării produsă la mei de *Sclerospora graminicola* (Nandini et al. 2017, *Scientific reports* 7: 2612). Un avantaj suplimentar al procedeelor de sinteză în medii biologice a nanoparticulelor este că acestea sunt procedee "verzi", care nu implică temperaturi ridicate sau pH extrem.

În cazul suspensiilor de nanoparticule de seleniu asociate cu nanoparticule de siliciu, stabilitatea este însă afectată de caracterul diferit al celor două tipuri de nanoparticule, puternic hidrofob al celor de nano-seleniu zerovalent și puternic hidrofil al celor de silice (hidratată). Iar utilizarea surfactanților pentru stabilizarea suspensiilor de nanoparticule prezintă riscul de a determina schimbarea compoziției biocoroanei (Müller et al. 2018, *Biomacromolecules* 19: 2657–2664).

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este de a realiza compatibilizarea dintre nanoparticulele de seleniu hidrofobe și nanoparticulele de silice hidrofile și de a crește stabilitatea suspensiei. Soluția tehnică este de a realiza un

procedeu de biosinteză a suspensiilor stabile de nanoparticule de seleniu elementar și silice asociate prin utilizarea unor tulpini înalt producătoare de proteine amfifile cu afinitate pentru carbohidrați cum ar fi expansine microbiene, cerato-platanine, swollenine, celulaze într-un mediu de cultură al unor microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante. Astfel de proteine amfifile desfac legăturile de hidrogen din structura materialului lignocelulozic (Cosgrove, 2017. *Annual review of microbiology*, 71: 479-497; Baccelli, 2015, *Frontiers in plant science* 5: 769), datorită masei moleculare mici, caracterului lor amfific (Bonazza et al. 2015, *Soft Matter* 11: 1723-1732) și structurii flexibile, care permite mișcarea separată a părții hidrofobe și a celei hidrofile (Sunde et al. 2017, *Annual review of biochemistry* 86: 585-608).

Procedeu de obținere a suspensiilor stabile de nanoparticule de seleniu elementar și silice, asociate conform prezentei invenții cuprinde următoarele etape:

- Cultivarea tulpinilor de microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante, înalt producătoare de celulaze și proteine amfifile cu afinitate pentru carbohidrați cum ar fi expansine microbiene, cerato-platanine, swollenine, pe medii de cultură care favorizează inducerea genelor respective, timp de 5 zile la temperatura de 28-30°C, pe agitator rotativ, 70 rpm;
- Separarea axenică a miceliului de microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante, de supernatant, prin centrifugare la 2500 x g;
- Umectarea materialului vegetal cu un conținut ridicat de siliciu în apă pură (Milli Q) sau bidistilată, în proporție de 1 g material vegetal la 1 ml apă pură sau bidistilată;
- Sterilizarea materialului vegetal cu un conținut ridicat de siliciu umectat prin trei cicluri repetate, de încălzire la 72-75°C timp de 25-30 min și răcire la temperatura camerei timp de 6 ore;
- Adăugarea aseptică peste materialul vegetal cu un conținut ridicat de siliciu, umectat și sterilizat, a miceliului umed de microorganisme, în raport de 1 g miceliu umed la 5 g material vegetal umectat și sterilizat;
- Aducerea peste amestecul miceliu - material vegetal a unui mediu mineral minimal steril, în raport de 80 ml mediu mineral minimal la 20 grame amestec miceliu - material vegetal;
- Purificarea proteinelor amfifile din supernatantul separat în prima etapă, concentrarea și sterilizarea lor prin filtrare, cu obținerea unei soluții proteice pentru adăugarea peste amestecul de miceliu și material vegetal, pentru a crește concentrația proteinelor amfifile;

- Incubarea amestecului miceliu – material vegetal- soluție proteică la temperatura de 28-30°C, pe agitator rotativ, 70 rpm, timp de 5-7 zile;
- Îndepărtarea miceliului și a materialului vegetal prin centrifugare, la viteză la 1000 x g sau prin filtrare, pe pori de minim 0,45 μm;
- Adăugarea aseptică a unei soluții de selenit de sodiu 10 mM, în supernatantul obținut la pasul anterior și conținând spori formați din miceliu, proteine amfifile în exces, nanoparticule de silice asociate cu carbohidrați, în raport de 10 ml soluție selenit de sodiu la 90 ml supernatant;
- Incubarea amestecului dintre supernatantul cu spori formați din miceliu, proteine amfifile, nanoparticule de silice și selenit de sodiu, la temperatura de 28-30°C, pe agitator rotativ, 70 rpm, timp de 5-7 zile, urmată de separarea prin ultrafiltrare tangențială pe membrană de 0,45 μm a miceliului nou format;
- Concentrarea suspensiei de nanoparticule rezultată ca permeat prin ultrafiltrare tangențială și apoi sterilizarea acesteia.

Tulpinile de microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante, înalt producătoare de proteine amfifile cu afinitate pentru carbohidrați pot fi selectate dintre tulpinile familiei *Hypocreaceae*, cum ar fi *Trichoderma harzianum* Td50b, *Trichoderma asperellum* Td36b, *Trichoderma* spp. T27.

Mediul care favorizează exprimarea de celuloze și expansine microbiene are următoarea compoziție: 10 g/L zer praf cu min. 12% proteină și min. 72% lactoză, 0,68 g/L KH_2PO_4 , 0,87 g/L K_2HPO_4 , 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl_2 , 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 2 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Materialul vegetal cu un conținut ridicat de siliciu include pleavă de orez, substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, borhot de orz precum și amestecuri ale acestora.

Mediul mineral minimal steril este în sine cunoscut, cel folosit conform prezentei invenții 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.

Purificarea proteinelor amfifile produse în mediul inițial se realizează prin cromatografie de afinitate hidrofobă pe o coloană hidrofobizată, iar concentrarea se realizează prin ultrafiltrare. Soluția proteică rezultată are o concentrație cuprinsă în intervalul 8-10 mg/ml

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Stimulează exprimarea genelor pentru cerato-platanine și celulaze, expansine microbiene sau swolenine, prin cultivare pe medii care conțin lactoză și proteine cu aminoacizi hidrofobi și aminoacizi cu catenă ramificată;
- ✓ Eliberează nano-particulele de silice din materialul vegetal prin acțiunea combinată a celulelor și proteinelor amfifile, expansine microbiene, cerato-platanine, sau swolenine, asupra materialului vegetal;
- ✓ Generează biologic nanoparticule de seleniu, prin detoxifierea reductivă a selenitului de către metabolismul microorganismelor cu acțiune de biostimulant pentru plante
- ✓ Favorizează formarea de nanoparticule de seleniu cu o biocoroană formată preponderent din proteine amfifile, expansine microbiene, cerato-platanine sau swolenine, nou formate sau pre-formate în mediul inițial recuperat prin centrifugare
- ✓ Determină asocierea compatibilă între nanoparticulele hidrofobe de seleniu și nanoparticulele hidrofile de silice asociate cu carbohidrați, prin proteine amfifile, expansine microbiene, cerato-platanine sau swolenine, proteine cu o flexibilitate ridicată și care permit mișcarea liberă a porțiunii hidrofile și a celei hidrofobe.
- ✓ Potențează acțiunea biostimulantă asupra plantelor de cultură prin asocierea nanoseleniului cu nanosilice și cu metaboliți produși de tulpinile biostimulante de microorganisme.

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

Exemplu 1. Se prepară 2 litri de mediu (mediul A), care favorizează exprimarea de celulaze și expansine microbiene, cerato-platanine sau swolenine, cu următoarea compoziție: 10 g/L zer praf cu min. 12% proteină și min. 72% lactoză, 0,68 g/L KH_2PO_4 , 0,87 g/L K_2HPO_4 , 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl_2 , 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 2 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ într-un balon de sticlă de 2,5 litri. Mediul se distribuie în 10 pahare Erlenmeyer de 1 litru, câte 200 mL în fiecare flacon. Paharele se astupă cu dop de vată, se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min și se răcesc. Fiecare pahar se inoculează cu 2 ml suspensie 10^9 propagule/mL din tulpina *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. Se incubă timp de 5 zile, la temperatura de 28°C, pe agitator rotativ la 70 rpm. După 5 zile se trece axenic miceliul cu mediul de cultură în 4 flacoane de centrifugă sterile de 500 mL. Tuburile se centrifughează într-o centrifugă Eppendorf 5810 (Eppendorf, Hamburg, Germania) cu

rotor batant A-4-81, în care se introduc cele 4 flacoane, echilibrate 2 câte 2. Se centrifughează la viteza de 3525 rpm, care corespunde, în cazul rotorului batant A-4-81, cu o raza de 18 cm, la o forță centrifugală relativă de 2500 x g.

Într-un balon de sticlă termorezistentă de 5 litri se aduc 500 g de pleavă de orez, peste care se adaugă sub agitare lentă, cu o baghetă de sticlă, 500 ml apă pură (MiliQ). Se lasă la temperatura camerei timp de 2 ore, amestecând din 10 în 10 minute. Se asupă cu dop de vată, se încălzește pe baie de apă termostată și cu agitare (Lab Companion 37 L, Cole Parmer, Vernon Hills, SUA), până la temperatura de 75°C, unde se menține timp de 25 minute. Se răcește la temperatura camerei timp de 12 ore și apoi se repetă ciclurile de încălzire / menținere / răcire de încă 2 ori. După realizarea celor 3 cicluri de încălzire / răcire (tindalizare), prin care se distrug formele vegetative de microorganisme, inclusiv cele care se formează din propagulele termorezistente în timpul procesului de răcire, balonul se inoculează cu miceliu.

Se adaugă aseptice 100 g de miceliu, biomasă propaspătă, de *Trichoderma harzianum* Td50b, peste cele 500 g de pleavă umectată și sterilizată. Se prepară 2,4 litri de mediu mineral minimal cu 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. Se sterilizează prin autoclavare timp de 20 min la 121°C, se răcește și se adaugă peste materialul vegetal umectat și sterilizat și miceliu.

Din supernatantul mediului inițial de inducere sunt separate și purificate proteinele amfifile prin cromatografie de afinitate hidrofobă. Cei aproximativ 1,8 litri supernatant sunt aplicați treptat pe o coloană de agaroză hidrofobizată, Phenyl Sepharose® 6 Fast Flow (45x10 cm, GE Healthcare, Chicago, IL, SUA), echilibrată cu 100 mM Tris/HCl, pH 7.5, conținând 2 M sulfat de amoniu. Proteinele amfifile care includ cerato-plataninele de interes sunt eluate cu apă, după un gradient linear, pornind de la tamponul de echilibrare până la 20 mM Tris/HCl pH 7.5. Frațiile conținând proteinele hidrofobe sunt concentrate prin ultrafiltrare tangențială, pe un sistem de ultrafiltrare tangențială ProstaK (Merck Group, Darmstadt, Germania), prevăzut cu o membrană Ultracel PLAC (Merck Group) din celuloză regenerată, cu limită de excludere de 1 kDa. Concentrarea proteinelor este continuată până la atingerea unei concentrații de 10 mg/ml proteine totale în retentat, controlată prin reacția biuretului. Cei aproximativ 20 ml de soluție proteică rezultați după concentrare sunt sterilizați prin filtrare pe filtru de 0,2 μm , și sunt adăugați peste amestecul miceliu - material vegetal pentru a crește concentrația proteinelor de interes, respectiv concentrația cerato-plataninelor.

Se incubă balonul de sticlă termorezistentă cu amestecul miceliu – material vegetal, îmbogățit în proteine amfifile de interes, la temperatura de 28°C, pe agitator rotativ, 70 rpm, timp de 7 zile. După 7 zile se îndepărtează axenic miceliul și biomasa de pleavă de siliciu. Se trece amestecul în flacoane de centrifugă sterile de 500 mL. Tuburile se centrifughează într-o centrifugă Eppendorf 5810 (Eppendorf) cu rotor batant A-4-81, în care se introduc flacoanele, echilibrate 2 câte 2. Se centrifughează la viteza de 2229 rpm, care corespunde, în cazul rotorului batant A-4-81, cu o raza de 18 cm, la o forță centrifugală relativă de 1000 x g.

Biomasa de Td50 împreună cu pleava de orez se recuperează, se usucă în condiții blânde, max. 40°C, și se folosește ca tratament în agricultură, ca biostimulant pentru plante. Biostimulanții pentru plante sunt o nouă categorie de agenți utilizați în tehnologiile de cultură ale plantelor, situate între fertilizanți și produsele de protecția plantelor. Aplicarea biostimulanților determină creșterea eficienței de utilizare a nutrienților, mărirea toleranței la stresurile abiotice și îmbunătățirea calității recoltei.

În supernatantul recuperat axenic conținând spori proveniți din miceliu, proteine amfifile, nanoparticule de silice asociate cu carbohidrați, se adăugă aseptice o soluție de selenit de sodiu 10 mM, în raport de 10 ml soluție selenit la 90 ml supernatant.

Supernatantul recuperat axenic cu selenit se distribuie aseptice în flacoane Erlenmeyer de 1 litru, câte 200 ml. Se astupă cu dopuri de vată. Se incubă mediul la temperatura de 28, pe agitator rotativ, 70 rpm, timp de 7 zile. Se formează biomasă, care sintetizează nanoparticule de seleniu. După 7 zile se separă miceliul nou format prin ultrafiltrare tangențială pe un sistem Prostack (Merck Group, Darmstadt, Germania), prevăzut cu o membrană de 0,45 μm din polisulfonă hidrofilă.

Suspensia de nanoparticule rezultată ca permeat este concentrată prin ultrafiltrare tangențială, pe un sistem de ultrafiltrare tangențială Prostack (Merck Group), prevăzut cu o membrană Ultracel PLAC (Merck Group) din celuloză regenerată, cu limită de excludere de 1 kDa, iar cei cca 200 ml de concentrat final sunt sterilizați pe o membrană de polietersulfonă hidrofilă (Millipore Express® SHC, Merck Group).

Produsul obținut este sub forma unei suspensii de culoare roșie.

Conținutul de siliciu total și seleniu total se determină în probe prin ICP-MS (sistem 7800 ICP-MS, Agilent, Santa Clara, CA, SUA). Se determină valori de 20,2±4,5 mg/mL Si și 1,05±0,27 mg/mL Se. Distribuția dimensiunii particulelor se determină prin folosirea tehnicii non-invazive de împrăștiere a luminii laser de fundal (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, Marea Britanie). Se determină o distribuție de nanoparticule hibride cu dimensiuni cuprinse între 72 și 124 nm. Populația de

nanoparticule este omogenă, cu un diametru dominant de 92 nm, volum maxim de 27,8%. Stabilitatea nanoparticulelor a fost estimată prin determinarea potențialului zeta, prin electroforeză capilară cuplată cu măsurarea mobilității particulelor prin efect Doppler (Zetasizer Nano ZS). Se determină o valoare cuprinsă între - 44±9,7 mV, valoare care indică o bună stabilitate a populației de nanoparticule hibride, silice – seleniu zerovalent. Această valoare este similară cu cea obținută pentru nanoparticulele hibride seleniu – silice sintetizate chimic și asociate prin molecule amfifile de lignosulfonat (Modrzejewska-Sikorska et al. 2017 *International journal of biological macromolecules*, 103: 403-408).

Exemplul 2. Se lucrează la fel ca în Exemplul 1, cu diferența că se folosește tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b, depozitată sub numărul P(F) 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) Budapesta, care este producătoare de swolenine. Materialul vegetal se umectează cu apă bidistilată. Incubarea tulpinii se realizează la 30°C, iar durata de incubare este de 5 zile. Incubarea tulpinii se realizează la 30°C, iar durata de incubare este de 5 zile. Se determină în final valori de 22,4±5,2 mg/mL Si și 0,98±0,23 mg/mL Se, pentru conținutul în siliciu total și seleniu total, cu o distribuție de nanoparticule hibride de dimensiuni cuprinse între 75 și 142 nm. Populația de nanoparticule este omogenă, cu un diametru dominant de 98 nm, volum maxim de 22,3%, iar potențialul zeta are valoare cuprinsă între - 38±8,2 mV, care indică o bună stabilitate.

Exemplu 3. Se lucrează la fel ca în Exemplul 1, cu diferența că se folosește tulpina *Trichoderma* spp. T27, care este producătoare de expansine microbiene. Îndepărtarea miceliului și a materialului vegetal se realizează prin folosirea unei unități de filtrare EZ-Fit™ (Merck Grup) cu membrană de 0.45 μm.

Se determină în final valori de 18,2±6,7 mg/mL Si și 0,94±0,28 mg/mL Se, pentru conținutul în siliciu total și seleniu total, cu o distribuție de nanoparticule hibride de dimensiuni cuprinse între 62 și 136 nm. Populația de nanoparticule este omogenă, cu un diametru dominant de 94 nm, volum maxim de 24,5%, iar potențialul zeta are valoare cuprinsă între - 36±9,3 mV, care indică o bună stabilitate.

Exemplu 4. S-a testat capacitatea nanoparticulelor hibride seleniu – silice, de a proteja plantele test față de acțiunea toxică a cadmiului. S-a lucrat cu plantule de rapiță de toamnă, *Brassica napus oleifera*, hibrid Maximus® PR₄₅D₀₃ (Pioneer Du Pont, Afumați, Ilfov, Romania), crescute în vase magenta cu mediu Murashige Skoog (MS) mineral, cameră climatică la 20±1°C, la un regim lumină – întuneric 16 / 8 ore, cu intensitate luminoasă mică (150 μE/m²/s) în timpul perioadelor de iluminare. În mediul

MS au fost incluse concentrații de 0,5 mM de CdSO₄. S-a lucrat în 8 variante, martor netratat cu cadmiu, martor tratat cu cadmiu, referință tratată cu 0,2 mg/L Se (ca selenit de sodiu), referință tratată cu 30 mg/L Si (ca acid silicic stabilizat cu colină), referință tratată cu 0,2 mg/L Seleniu (ca selenit de sodiu) și 30 mg/L Si (ca acid silicic stabilizat cu colină) și produse de testat, conform Exemplelor 1-3, aplicate ca 2 ml la litru, corespunzând la 40 mg Si (ca nanoparticule de silice) și 2 mg Se (ca nanoparticule de seleniu). Suspensiile s-au realizat în soluții 1% de esteri etilici ai uleiului de floarea-soarelui (ca adjuvant de stropire). S-au aplicat pe fiecare plantulă de 5 zile câte 50 μl soluții de testat, prin utilizarea unei micro-pipete. Martorul netratat a fost tratat cu apă. Fiecare variantă a inclus câte 80 plantule, distribuite în 4 repetiții de câte 20 plantule (2 vase Magenta cu câte 10 plantule). Repetițiile au fost randomizate conform unei scheme de randomizare în pătrat latin. După 10 zile s-au determinat caracteristicile morfologice ale plantelor (masa umedă a tulpiniței și masa umedă a rădăcinuței), ca și peroxizi lipidici (ca malondialdehidă, cu acid tiobarbituric (Heath și Parker, 1968, *Archives of biochemistry and biophysics*, 125:189-198). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos.

Tab.1. Influența tratamentelor cu produse conținând suspensie de nanoparticule hibride și cu produse de referință asupra toxicității cadmiului pentru plantule de rapiță (cv. Maximus® PR₄₅D₀₃)

Varianta experimentală	Masa proaspătă tulpiniță (mg)	Masa proaspătă rădăcinuța (mg)	Peroxizi lipidici (MDA, μM/g s.p.)
Martor netratat, fără Cd	124±23	25±9	5,18±0,83
Martor netratat, +Cd	22±10	10±5	8,23±1,64
Selenit de sodiu, 0,2 mg/L Se, +Cd	103±16	18±7	6,37±0,73
Acid silicic, 30 mg/L Si	110±20	23±6	6,22±0,82
Selenit de sodiu, 0,2 mg/L Se + acid silicic, 30 mg/L Si, +Cd	120±15	27±9	5,14±0,87
Produs conform Ex.1, +Cd	144±14	37±8	4,83±1,08
Produs conform Ex.2, +Cd	128±19	32±12	4,23±1,48
Produs conform Ex.3, +Cd	132±16	30±8	4,72±1,57

Produsele realizate conform exemplilor au o eficacitate superioară în protejarea față de efectele toxice ale acidului silicic și/sau seleniului.

Revendicări

1. Proceda de obținere a suspensiilor stabile de nanoparticule de seleniu elementar și silice, asociate **caracterizat prin aceea că** include următoarele etape: cultivarea tulpinilor de microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante, înalt producătoare de proteine amfifile cu afinitate pentru carbohidrați, pe medii care favorizează inducerea genelor respective, timp de 5 zile la temperatura de 28-30°C, pe agitator rotativ, 70 rpm, separarea axenică a miceliului de microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante, de supernatant, prin centrifugare, la 2500 x g, umectarea materialului vegetal cu un conținut ridicat de siliciu în apă pură sau bidistilată, în proporție de 1 g material vegetal la 1 ml apă pură sau bidistilată, sterilizarea materialului vegetal cu un conținut ridicat de siliciu, umectat, prin trei cicluri repetate, de încălzire la 72-75°C timp de 25-30 min și răcire la temperatura camerei timp de 6 ore, adăugarea aseptică peste materialul vegetal cu un conținut ridicat de siliciu, umectat și sterilizat a miceliului umed de microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante, în raport de 1 g miceliu umed la 5 g material vegetal umectat și sterilizat, aducerea peste amestecul miceliu - material vegetal a unui mediu mineral minimal steril, în raport de 80 ml mediu mineral minimal steril la 20 grame amestec miceliu - material vegetal, separarea proteinelor amfifile din supernatantul separat în prima etapă și purificarea, concentrarea și sterilizarea lor prin filtrare și obținerea unei soluții proteice pentru adăugarea peste amestecul de miceliu - material vegetal, pentru a crește concentrația proteinelor amfifile, incubarea amestecului miceliu – material vegetal-soluție proteică la temperatura de 28-30°C, pe agitator rotativ, 70 rpm, timp de 5-7 zile, îndepărtarea miceliului și a materialului vegetal prin centrifugare, la viteză la 1000 x g sau prin filtrare, pe pori de minim 0,45 μm, adăugarea aseptică a unei soluții de selenit de sodiu 10 mM, în supernatantul obținut la pasul anterior și conținând spori formați din miceliu, proteine amfifile în exces, nanoparticule de silice asociate cu carbohidrați, în raport de 10 ml soluție selenit de sodiu la 90 ml supernatant, incubarea mediului cu spori formați din miceliu, proteine amfifile, nanoparticule de silice, selenit de sodiu la temperatura de 28-30°C, pe agitator rotativ, 70 rpm, timp de 5-7 zile, urmată de separarea prin ultrafiltrare tangențială pe membrană de 0,45 μm a miceliului nou format, concentrarea

suspensiei de nanoparticule rezultată ca permeat prin ultrafiltrare tangențială și apoi sterilizarea acesteia.

2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** tulpinile de microorganisme cu acțiune de biostimulant pentru plante, înalt producătoare de proteine amfifile cu afinitate pentru carbohidrați se selectează dintre tulpinile familiei Hypocreaceae, cum ar fi *Trichoderma harzianum* Td50b, *Trichoderma asperellum* Td36b, *Trichoderma* spp. T27.

3. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** mediul care favorizează exprimarea de proteine amfifile cu afinitate pentru carbohidrați are următoarea compoziție: 10 g/L zer praf cu min. 12% proteină și min. 72% lactoză, 0,68 g/L KH_2PO_4 , 0,87 g/L K_2HPO_4 , 1,2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl_2 , 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 2 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** materialul vegetal cu un conținut ridicat de siliciu include pleavă de orz, substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, borhot de orz precum și amestecuri ale acestora.

5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** purificarea proteinelor amfifile produse în mediu inițial se realizează prin cromatografie de afinitate hidrofobă pe o coloană hidrofobizată, iar concentrarea se realizează prin ultrafiltrare.