



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00842

(22) Data de depozit: 18/12/2020

(41) Data publicării cererii:
30/06/2022 BOPI nr. 6/2022

(71) Solicitant:
• EM ENVIRONMENTAL SOLUTIONS
S.R.L., STR.DIȚEȘTI, NR.927, SAT
DIȚEȘTI, COMUNA FILIPEȘTII DE
PĂDURE, PH, RO

(72) Inventatori:
• MĂRGĂRIT ELENA, DRUMUL TABEREI,
NR.14, BL.B3, SC.A, AP.14, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• 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;
• CHEOFA OANA ANDREEA,
STR.LABORATOR, NR.14, AP.11,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU SELECȚIA
CONSORȚIILOR DE MICROORGANISME DESTINATE
BIOCOMPOSTĂRII ȘI BIOAUGMENTĂRII**

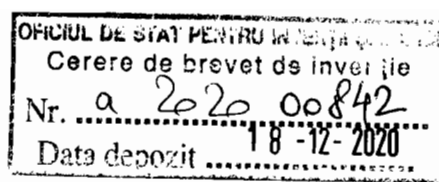
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de selecție a conso-
rțiilor de microorganisme utilizate pentru formarea de
composturi aplicabile pentru nutriția și protecția cul-
turilor agricole. Procedeu, conform invenției, cuprinde
etapele: selecția potențialelor conso-
rții de micro-
organisme mutualiste prin co-cultivarea izolatelor obți-
nute prin bioprospectare, pe medii microbiologice
uzuale și identificarea combinațiilor compatibile, selecția
în funcție de capacitatea de a degrada substratul de
interes prin cultivarea la 28°C a respectivelor conso-
rții

timp de 48...96 h, pe mediu minimal lichid incubat care
include substratul-țintă steril, maparea chimică a
substratului-țintă cu evidențierea în supernatant a com-
pușilor rezultați din degradare și analiza cantitativă a
diversității microbiene prin amplificarea enzimatică
cantitativă a secvențelor de ADN specifice.

Revendicări: 3





PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU SELECȚIA CONSORȚIILOR DE MICROORGANISME DESTINATE BIOCUMPOSTĂRII ȘI BIOAUGMENTĂRII

Prezenta invenție se referă la un procedeu de înalt randament pentru selecția consorțiilor de microorganisme destinate: (i) biocompostării biomasei excedentare, rezultate din fluxurile laterale ale bioeconomiei (de exemplu vreji de tomate din culturile în seră), cu formarea de composturi aplicabile pentru nutriția și protecția culturilor agricole; (ii) bioaugmentării epurării apelor reziduale, în special cele din industria agro-alimentară, cu reducerea formării de nămoluri de epurare (biosolide).

Sunt cunoscute diferite procedee pentru selecția de înalt randament a tulpinilor / izolatelor de microorganisme care produc enzime / complexe proteice cu rol în degradarea biomasei lignocelulozice excedentare și/sau a fluxurilor laterale reziduale. Izolatele sunt selectate de obicei prin cultivare pe medii selective, de obicei medii minimale care conțin numai materialul de degradat, de ex. celuloză microcristalină sau lignoceluloză, ca unică sursă de carbon și energie. Brevetul US 6951714 B1 se referă la o metodă de izolare a unei specii microbiene dintr-un mediu sursă, care include următoarele etape: colectarea a cel puțin unui microorganism din mediul sursă; furnizarea unui volum de mediu de cultură pentru microorganism echivalent cu cel puțin volumului unui godeu dintr-o placă de microtitrare, și care conține substratul de interes pentru biodegradare; incubarea microorganismului în mediu de cultură pentru o perioadă de timp suficientă pentru a duce la creșterea microorganismului, dacă mediul este capabil să susțină o astfel de creștere; detectarea creșterii microorganismului și identificarea microorganismului, prin tehnici imunologice sau prin secvențierea unor gene specifice, cum ar fi cea care codifică pentru 16S rRNA la bacterii.

Brevetul US US7022511 B2 revendică inclusiv procedeu prin care a fost selectat consorțiul format din tulpinile de microorganisme CBTCC/5203, CBTCC/5303 și CBTCC5403, depozitate la IMTECH, Chandigarh, India, cu numerele de acces MTCC 5094, MTCC 5095 și MTCC 5098, care au capacitate de degradare a ligninei. Procedeu constă în următoarele etape: a) îmbogățirea florei bacteriene din arealul folosit pentru prelevare; b) izolarea bacteriilor ligninolitice folosind diferite medii; c) cultivarea bacteriilor izolate în diferite condiții de mediu, temperatură, pH-ul, sursa de carbon etc.; d) verificarea capacității

izolatelor de degradare a ligninei prin inocularea izolatelor bacteriene în 10 ml de lignină 0,4%; e) selectarea izolatelor bacteriene care decolorează ligninei în mod eficient; f) adaptarea celor care sunt eficiente la cultivarea pe lignină g) cultivarea tulpinilor bacteriene în amestec pentru a se vedea interacțiile / efectul lor sinergic în degradarea ligninei; h) selectarea consorțiului microbial care cuprinde cele trei izolate bacteriene. Un astfel de procedeu nu este un procedeu de înalt randament, pentru că este prea laborios și nu se poate aplica într-un timp scurt, pe matrici de izolate / tulpini de testat.

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

În cazul în care se urmărește selectarea unor tulpini activatori de compostare este necesar să se monitorizeze și activitatea antagonistă față de agenții fitopatogeni. Cererea de brevet US 20120107915 protejează un procedeu de screening rapid al tulpinilor de microorganisme antagoniste față de agenții fitopatogeni, care implică utilizarea unor platforme multitest. Platformele multitest includ între 12 și 1500 de izolate, etalate pe un mediu de cultură într-o micromatrice în care sunt distribuite și microorganismele fitopatogene. Izolatele de microorganisme testate sunt sortate prin citometrie în flux înainte de a fi cocultivate cu agenții fitopatogeni. Procedeul nu asigură însă selecția tulpinilor de microorganisme cu activitate de biodegradare ridicată.

Brevetul RO 131224 B1 descrie un procedeu de selecție a consoțiilor de microorganisme care degradează materialul vegetal care este alcătuit din următoarele etape: depunerea pe o placă cu un singur godeu a unui film detector; adăugarea peste filmul detector a unui mediu minimal, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic, hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer; inocularea cu 12 izolate de testat, randomizate în 8 repetiții; incubarea timp de 60 - 120 ore a plăcii, cu prelevarea imaginii filmului detector și, respectiv, a coloniilor de microorganisme,

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

Dezavantajul acestui procedeu este dat de eliminarea din faza de selecție a tulpinilor microbiene care nu degradează direct substratele de interes și nu au capacitatea de a crește singure pe respectivele substrate. Aceste tipuri de tulpini, relativ recent puse în evidență (Li et al. 2020. *Environment International*, 136, 105473) sunt implicate în (co)metabolizarea eficientă a substratelor de interes și au rol important atât în bioaugmentare (Shi et al. 2020, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 103900), cât și în biocompostare (De Corato et al. 2018, *Biological Control*, 124, 1-17).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu prin care să se selecteze consorțiile de microorganisme mutualiste care includ și tulpini microbiene care nu degradează direct substratele de interes, dar care contribuie la (co)metabolizarea acestora, inclusiv prin producerea de potențiatori ai sistemelor enzimatice implicate în degradarea compușilor organici recalcitranți, ca de ex. lignoceluloză, celuloză modificată, singură sau asociată polimeri de sinteză, compuși (poli)aromatici naturali sau de sinteză.

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

„Sistemele implicate în degradarea compușilor organici recalcitranți” includ: glicozil-hidrolaze (celulaze, hemicelulaze, enzime care degradează pectina); oxido-reductaze care desfac macromolecula de lignină în compuși fenolici mai simpli de asimilat de microorganisme, de tipul laccazelor și polifenoloxidazelor, și

care acționează și asupra altor substraturi aromatice, inclusiv hidrocarburi aromatice policiclice; esteraze care eliberează acizii cinamici esterificați cu porțiunile terminale ale hemicelulozelor (porțiuni esterificate care stabilesc interacții de tip pi cu lignina, între porțiunea fenolică a acizilor cinamici și resturile fenolice ale ligninei).

„Potențiatorii enzimelor cu activitate de degradare a lignocelulozei” se referă la proteine cu activitate non-catalitică care slăbesc structurile de ordin superior ale fibrelor de celuloză prin desfacerea legăturilor de hidrogen (cum sunt de ex. cerato-plataninele, trecute recent în revistă de Luti et al. 2020, *Fungal Biology Reviews*, 34, 13-24, ca și la compușii care leagă inhibitorii enzimelor cu activitate de degradare a lignocelulozei, inhibitori care apar în procesele de pre-tratament sau de degradare a materialului lignocelulozic.

”Celuloza modificată, singură sau asociată polimeri de sinteză” se referă la fibrele de serrisinteză, de tip viscoza, folosite împreună cu fibrele de polietilentereftalat, de ex., pentru a produce materialele neșesute folosite pentru șervețelele dezinfectante. Aceste șervețele dezinfectante au devenit un adevărat poluant mecanic al sistemelor de canalizare (Munoz et al. 2018, *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 20268-20279).

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

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

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Selecția potențialelor consorții de microorganisme mutualiste prin co-cultivarea izolatelor obținute prin bioprospectare, pe medii microbiologice uzuale, incubate la temperatura camerei timp de 24-72 ore, în interacții multiple în matrice de 96 de colonii, și identificarea combinațiilor compatibile;
- ✓ Selectarea consorțiilor de microorganisme mutualiste care au capacitatea de a biodegrada substratul de interes prin cultivare la 28°C a respectivelor consorții timp 48-96 ore, pe mediu minimal lichid incubat care include substratul-țintă steril, urmată de: (i) maparea chimică a substratului-țintă pe care au crescut microorganismele asociate în consorțiu prin imagistică FT-IR; (ii) punerea în evidență în supernatant a compușilor rezultați prin degradarea substratului-țintă și (iii) analiza cantitativă a diversității microbiene din substratul-țintă prin amplificarea enzimatică cantitativă a secvențelor de ADN specifice;

Etapă de selecție a potențialelor consorții de microorganisme mutualiste se realizează după cum urmează:

- ✓ Inocularea în condiții axenice a unui mediu uzual agarizat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini din oțel inox, a 10...20 μl de inocul lichid, cu circa 10^7 ... 10^8 ufc/ml, dintr-o placă cu 96 de godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat;
- ✓ Incubarea timp de 24 - 72 ore a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme dezvoltare cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 4 în 4 ore;
- ✓ Analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor soft-uri specializate și identificarea combinațiilor de microorganisme care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare;
- ✓ Selectarea potențialelor consorții de microorganisme mutualiste prin gruparea tulpinilor / izolatelor de microorganisme care se stimulează reciproc.

Substratele-țintă includ: șervețele dezinfectante din materiale neșesute care includ derivați de celuloză și materiale plastice de sinteză; vreji de tomate; paie de grâu; coceni de porumb; pălării de floarea-soarelui.

Pentru selectarea consorțiilor care au antagonism față de microorganismele fitopatogene care includ în ciclul lor de dezvoltare o etapă de dezvoltare pe resturile vegetale, etapa de co-cultivare a consorțiului de microorganisme

mutualiste se realizează împreună cu o tulpină de microorganism fitopatogen care include în ciclul lor de dezvoltare o etapă de dezvoltare pe resturile vegetale și pe mediu minimal lichid care conține resturi vegetale sterile.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Permite selectarea consorțiilor microbiene mutualiste care includ și tulpini microbiene care nu degradează direct substratele de interes, dar care contribuie la (co)metabolizarea acestora, inclusiv prin producerea de potențiatori ai sistemelor enzimatic implicate în degradarea compușilor organici recalcitranți;
- Evidențiază acțiunea de bio-degradare a substratului țintă prin două tehnici complementare, respectiv maparea chimică a substratului-țintă pe care au crescut microorganismele asociate în consorțiu prin imagistică FT-IR și punerea în evidență în supernatant a compușilor rezultați prin degradarea substratului-țintă;
- Validează implicarea izolatelor inițial selectate în bio-degradarea substratului țintă prin analiza cantitativă a diversității microbiene din consorțiu dezvoltat pe respectivul substrat-țintă.

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

Exemplul 1. Se prepară un mediu agarizat cartof glucoză agar conform instrucțiunilor producătorului. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min și se răcește până la 50-55°C. Se transferă aseptice pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu un volum de circa 63 ml de mediu agarizat, pentru a se obține un strat de mediu agarizat de circa 8 mm grosime.

Acest strat de mediu de cultură agarizat se inoculează cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții. Inocularea se realizează cu mici cantități de inocul lichid, prelevat cu ajutorul unui replicator de inox cu 96 pini (cum este de ex. MULTI -BLOT™ Replicator System, V&P Scientific, San Diego, CA, SUA), dintr-o placă cu 96 de godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat.

Procedeele de diluare și randomizare este descris în continuare. Într-o placă cu 96 de godeuri se distribuie aseptice tampon fosfat salin steril, câte 225 μl în fiecare godeu. Culturi re-împrospătate din tulpinile de testat, realizate pe mediu lichid decoct de cartof – glucoză, timp de 24 ore în cazul procariotelor (bacterii, gram-negative sau gram-pozitive, cianobacterii) și de 48 ore în cazul altor microorganisme, se normalizează prin diluție la 10⁷ ufc/ml (în cazul procariotelor) li

10^8 ufc/ml (în cazul microorganismelor eucariote). Din aceste culturi reîmprospătate și diluate se preiau 25 μ l, care se aduc axenic peste cei 225 μ l tampon fosfat salin steril, conform schemei de randomizare prezentată în tab. 1.

Tab.1. Schema de randomizare a celor 12 tulpini în 8 repetiții aplicată pentru placa cu 96 godeuri.

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

Replicatorul de inox se sterilizează prin flambare, se răcește și apoi se scufundă în placa de 96 godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat. Pe fiecare pin se preiau câte 10-20 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 agarizat, prin presarea ușoară a replicatorului cu 96 pin pe suprafața respectivului mediu de cultură.

Placa inoculate se incubă timp de 24 - 72 ore, la temperaturi 30°C, în funcție de tipul de tulpini testate. Din 4 în 4 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, cu ajutorul unui sistem de prelevare imagini – de exemplu un aparat de foto de tip DSRL, cu dispozitiv de macrofotografiere și cu intervalometru.

În paralel se realizează o placă martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat. Cele 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, conform tab.1, se inoculează cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, care a fost în prealabil sterilizat prin flambare, pe o placă cu 96 godeuri.

Plăcile martor cu 96 de godeuri, în care microorganismele inoculate se dezvoltă individual, fără a interacționa, se incubă timp de 24 - 72 ore, la aceeași temperatură ca și plăcile cu un singur godeu, în care microorganismele interacționează. Din 4 în 4 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme dezvoltate în fiecare godeu, cu ajutorul unui sistem de prelevare imagini. Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii se prelucrează cu ajutorul softului specializat, *open acces*, Colonyzer (Lawless et al. 2010, BMC

Bioinformatics, 11, 287). Se obțin date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office, Microsoft, Redmond, WA, SUA), separat pentru dezvoltarea coloniilor și pentru formarea suprafeței colorate ca urmare a interacției celobiozei eliberate din materialul lignocelulozic cu filmul detector. Se compară suprafețele coloniilor în proba cu 12 tulpini / izolate de testat, care au fost distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină / izolat de testat s-a dezvoltat separat. Se identifică prin analiza varianței (ANOVA, StatSoft - Dell Software, Tulsa, OK, SUA) microorganismele care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare.

Procedeu se repetă până se selectează consorții de microorganisme mutualiste, care se stimulează reciproc în dezvoltare. Aceste consorții se verifică pentru capacitatea de a biodegrada substratul de interes. Se prepară un mediu minimal M9 care conține la 1 litru: Na_2HPO_4 (anhidru) 6 g; KH_2PO_4 3 g; NaCl 0.5 g; NH_4Cl 1 g, și nouă microelemente, în următoarele concentrații 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; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 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; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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 aduce pH la 7,4 cu NaOH și se sterilizează.

Se distribuie în pahare Erlenmeyer sterile de 100 ml câte 15 ml mediu minimal și 0,3 g șervețele dezinfectante din materiale nețesute care includ derivați de celuloză și materiale plastice de sinteză. Se inoculează cu câte 0,1 ml din fiecare tulpină a consorțiului de microorganisme mutualiste, 10^9 ufc/ml. Se cultivă la 28°C respectivele consorți, timp 48 ore, pe mediu minimal lichid care include substratul-țintă.

Se extrage din paharele Erlenmeyer proba de șervețele dezinfectante din materiale nețesute și se face maparea chimică prin imagistică FT-IR, cu utilizarea unui echipament adecvat (de ex. Nicolet™ iN10 MX Infrared Imaging Microscope, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA).

În supernatant se pun în evidență glucidele reducătoare produse de microroganisme, prin reacția cu reactiv dintrosalicilic. Din proba de șervețele dezinfectate se extrage ADN prin tehnici specifice (ca de ex. cu ajutorul kit-ului ZR Microbe DNA Kit Miniprep™, Zymo Research, Irvine, CA, SUA, conform instrucțiunilor producătorului) și apoi se face analiza cantitativă a diversității microbiene din

substratul-țintă prin amplificarea enzimatică cantitativă a secvențelor de ADN specifice, prin tehnicile cunoscute – ca de ex. qRT-PCR, pe un sistem CFX96 Real-Time (Biorad, Hercules, CA, SUA), folosind protocolul descris de Woodman et al. 2016, *Current protocols in microbiology*, 42(1), A-3D.

Exemplu 2. Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că substratul țintă pentru biodegradare sunt vreji de tomate, iar inocularea se realizează și cu 0,1 ml 10^8 ufc *Phytophthora* sp.

paie de grâu; coceni de porumb; pălării de floarea-soarelui.

Exemplu 3. Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că substratul țintă pentru biodegradare sunt paiele de grâu, iar inocularea se realizează și cu 0,1 ml 10^8 ufc *Pyrenophora tritici-repentis*.

Exemplu 4. Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că substratul țintă pentru biodegradare sunt paiele de grâu, iar inocularea se realizează și cu 0,1 ml 10^8 ufc *Fusarium graminearum*.

Exemplu 5. Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că substratul țintă pentru biodegradare sunt paiele de grâu, iar inocularea se realizează și cu 0,1 ml 10^8 ufc *Stagonospora nodorum*.

Exemplu 6. Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că substratul țintă pentru biodegradare sunt cocenii de porumb, iar inocularea se realizează și cu 0,1 ml 10^8 ufc *Aspergillus flavus*.

Exemplu 7. Se lucrează ca în exemplul 1, cu diferența că substratul țintă pentru biodegradare sunt pălăriile de floarea soarelui, iar inocularea se realizează și cu 0,1 ml 10^8 ufc *Botrytis cinerea*.

Revendicări

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: Selecția potențialelor consorții de microorganisme mutualiste prin co-cultivarea izolatelor obținute prin bioprospectare, pe medii microbiologice uzuale, incubate la temperatura camerei timp de 24-72 ore, în interacții multiple în matrice de 96 de colonii, și identificarea combinațiilor compatibile; Selectarea consorțiilor de microorganisme mutualiste care au capacitatea de a biodegrada substratul de interes prin cultivare la 28°C a respectivelor consorții timp 48-96 ore, pe mediu minimal lichid incubat care include substratul-țintă steril, urmată de: (i) maparea chimică a substratului-țintă pe care au crescut microorganismele asociate în consorțiu prin imagistică FT-IR; (ii) punerea în evidență în supernatant a compușilor rezultați prin degradarea substratului-țintă și (iii) analiza cantitativă a diversității microbiene din substratul-țintă prin amplificarea enzimatică cantitativă a secvențelor de ADN specifice.

2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de selecție a potențialelor consorții de microorganisme mutualiste se realizează după cum urmează: inocularea în condiții axenice a unui mediu uzual agarizat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini din oțel inox, a 10...20 μ l de inocul lichid, cu circa 10^7 ... 10^8 ufc/ml, dintr-o placă cu 96 de godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat; incubarea timp de 24 - 72 ore a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme dezvoltate cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 4 în 4 ore; analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor soft-uri specializate și identificarea combinațiilor de microorganisme care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare; selectarea potențialelor consorții de microorganisme mutualiste prin gruparea tulpinilor / izolatelor de microorganisme care se stimulează reciproc.

3. Procedeu conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că substratele-țintă includ: șervețele dezinfectante din materiale nețesute care includ derivați de celuloză și materiale plastice de sinteză; vreji de tomate; paie de grâu; coceni de porumb; pălării de floarea-soarelui.