



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **SESAN TATIANA EUGENIA,
BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPESCU MARIANA, STR. VALEA ROȘIE
NR. 6, BL. 62, SC. C, ET. 1, AP. 35,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de selecție a consoțiilor de microorganisme din materialul vegetal, utilizați în agricultură. Procedeu conform invenției constă în selectarea microorganismelor care prezintă concomitent caracteristici superioare de degradare a matricei lignocelulozice din materialul vegetal, cu

eliberarea maximă a biosiliciului inclus în această matrice, și de solubilizare prin complexare a siliciului care este utilizat în tehnologii agricole, ca inputuri.

Revendicări: 5



PROCEDEU DE SELECȚIE A CONSORȚIILOR DE MICROORGANISM CARE ELIBEREAZĂ ȘI SOLUBILIZEAZĂ BIOSILICIUL DIN MATERIALUL VEGETAL

Prezenta invenție se referă la un procedeu prin care sunt selectate microorganismele care au concomitent caracteristici superioare de: (i) degradare a matricei lignocelulozice, cu eliberarea biosiliciului inclus în această matrice, și (ii) de solubilizare prin complexare a respectivei forme de siliciu.

Sunt cunoscute diferite procedee prin care se solubilizează biosiliciul din materialul vegetal, pentru a fi reutilizat ca sursă de nutrient pentru plante. În pofida abundenței sale în scoarța pământului, rezervorul de siliciu biodisponibil pentru plante în sol este limitat, reciclarea biosiliciului fiind esențială pentru asigurarea pe termen lung a fertilității solurilor (Haynes, 2014, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177: 831-844). Rolul benefic al siliciului pentru plante a fost demonstrat prin utilizarea unor mutante care au o capacitate redusă de preluare a siliciului din sol (Ma și Yamaji, 2015. *Trends in Plant Science*, 20:435-442). Exportul de siliciului din sol prin biomasa recoltată de plante cultivate, fără reciclare, 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 tulpini de porumb, va accentua fenomenele de desiliciere a solurilor. Pe de altă parte biosiliciul complică utilizarea materialului vegetal în procesele de biorafinare (Le et al. 2015, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9: 109-121).

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

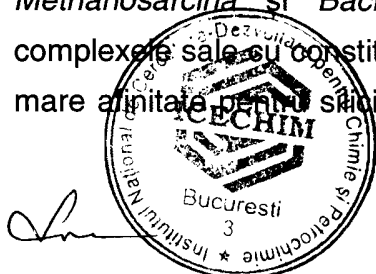
Brevetul CN 102260116 se referă la un procedeu de recuperare a biosiliciului din pleava de orz, care implică: amestecarea a 50-75% pleavă orz, cu 0,5-1,5% consorțiu microbian și cu apă până la 100%; fermentarea semisolidă a amestecului timp de 72 ore; extracția substratului fermentat, cu 20% (procente de masă) soluție NaOH, la 95°C timp de 6 ore; filtrarea pentru a îndepărta reziduurile după extracție și obținerea extractului de biosiliciu. Consorțiul microbian este alcătuit din *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus*, și drojdie într-un raport în greutate de: 50 până 80%, 0 până la 50% și respectiv, 0 până la 35%. Nu sunt revendicate tulpini specifice de microorganisme selectate pentru activitatea specifică, prin care să se realizeze



eliberarea maximă a biosiliciului din matricea lignocelulozică a materialului vegetal. Procedul de extracție a biosiliciului implică utilizarea unei soluții alcaline, la temperaturi ridicate. Brevetul nu descrie utilizarea ulterioară a materialului vegetal extras în procedee de biorafinare.

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

Nu au fost descrise până în prezent procedee prin care să se realizeze selecția microorganismelor care au concomitent caracteristici superioare de: (i) degradare a matricei lignocelulozice, cu eliberarea biosiliciului inclus în această matrice, și (ii) de solubilizare prin complexare a respectivului siliciu. În materialul vegetal siliciul se regăsește sub două forme: complexat în matricea extracelulară (He et al. 2015. *New Phytologist*, 206: 1051-1062) sau precipitat ca dioxid de siliciu amorf, $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Epstein 1999, *Annual Review of Plant Biology*, 50: 641-664). Solubilizarea siliciului amorf se realizează sub acțiunea silicazei, o polipeptidă care catalizează interconversia dintre diferitele forme de dioxid de siliciu / silice, inclusiv cel amorf, și acidul silicic, care a fost identificată și în tulpini bacteriene din genurile *Methanosarcina* și *Bacillus* (Brevet SUA 8822188). Eliberarea siliciului din complexele sale cu constituenții matricei lignocelulozice implică complexanți cu o mai mare afinitate pentru siliciu. Complexanți siliciului cresc biodisponibilitatea acestuia



pentru plante (Cerere de brevet SUA 20140116103). De asemenea există evidențe care sugerează translocarea prin xilem a acidului monosilicic sub formă complexată. Concentrația acidului monosilicic în xilem este, uneori, cu mult peste limita de solubilitate (circa 2 mM) în apă, fără a se produce formarea precipitatelor de silice coloidală (Mitani și Ma 2005, *Journal of Experimental Botany*, 56: 1255-1261).

S-a demonstrat că o serie de catecolați naturali, ca de exemplu acidul protocatehuic / acidul 3,4-dihidroxibenzoic sau acidul galic / acidul 3,4,5-trihidroxibenzoic (Demadis et al 2011, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50: 13866-13876) sau o serie de aminoacizi ca histidina sau fenil-alanina (Demadis și Mavredaki, 2005, *Environmental Chemistry Letters*, 3: 127-131) au capacitatea de crește rata de dizolvare a siliciului din silicea amorfă, prin formare de complecși. Catecolați au fost raportați ca fiind siderofori pentru bacterii care au efecte de favorizare a creșterii plantelor și de activare a sistemului de apărare din plante (Aznar și Dellagi 2015, *Journal of Experimental Botany*, 66: 3001-3010). Aminoacizii sunt biostimulanți pentru plante (Calvo et al 2014, *Plant and Soil*, 383: 3-41). Deci tulpinile de microorganisme care solubilizează siliciul prin complexare în astfel de metaboliți exo-celulari ar avea caracteristici benefice pentru plante și prin aplicare directă.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este de a descrie un procedeu prin care să se realizeze selecția consoțiilor de microorganisme care eliberează siliciul din matricea lignocelulozică, inclusiv prin extragerea celui complexat de componentele respectivei matrice, și îl mențin în soluție ca acid silicic, eventual complexat.

Termenul "acid silicic" se referă la 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 piroxilicic ($H_6Si_2O_7$) 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 polimerizare avansată ($SiO_2 \cdot nH_2O$) este denumit silicagel, în stare semnificativ hidratată, silice amorfă, atunci când este parțial dehidratat, opal când procesul de 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).

Este un alt scop al acestei invenții de a prezenta un agent de gelifiere pentru mediul de cultură a izolatelor testate care să nu fie degradat de enzimele care



acționează asupra matricei celulare și care să permită o difuziune optimă a compușilor amfifili potențial formați prin complexarea formelor de siliciu solubil. Una din problemele tehnice în identificarea rapidă a izolatelor de microorganisme care produc amestecuri de enzime cu activitate de degradare a materialului lignocelulozic, glicozil-hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor și oxidaze care acționează asupra lignocelulozei, este determinată de faptul că astfel de amestecuri de enzime degradează uneori și polizaharidele folosite uzual ca agenți de gelifiere a mediilor de cultură – agarul, agaroză, gellanul, xanthanul. Gardner et al. (2012) (*Biotechnology Letters*, 34:81-89) au dezvoltat un procedeu de screening în care folosesc un mediu solidificat cu poliacrilamidă (în locul agenților uzuali de gelifiere), cu omogenat de tulpini de porumb pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac (AFEX), ca unică sursă de carbon și energie. Unele din microorganismele din sol au însă capacitatea ridicată de a degrada și poliacrilamida, cu utilizarea ei atât ca sursă de carbon și energie, cât și ca sursă de azot (Weng et al. 2010, *Journal of Hazardous Materials*, 175:327-330;), deci poliacrilamida nu este cel mai convenabil agent de gelifiere al mediilor utilizate pentru screening izolatelor de microorganisme cu capacitate ridicată de degradare a materialului lignocelulozic.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape

1. Depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur a unui mediu minimal sterilizat, cu o grosime de 8 mm, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat, ca unică sursă de carbon și energie, și care este hidrogelificat cu un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol;
2. Inocularea în condiții axenice a mediului minimal hidrogelificat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și incubarea timp de 60 - 120 ore, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme dezvoltare, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 12 în 12 ore;
3. Realizarea unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat, prin inocularea în condiții axenice, a celor 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, într-o placă de microtitrare cu 96 godeuri, care conține în fiecare godeu aceeași grosime de mediul minimal hidrogelificat, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat ca unică sursă de carbon;



4. Incubarea timp de 60 - 120 ore, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginilor, din 12 în 12 ore;
5. Evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa cu un singur godeu și în placa martor cu 96 godeuri și prelevarea imaginii plăcilor;
6. Analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor soft-uri specializate, compararea rezultatelor din proba cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină / izolat de testat s-a dezvoltat separat și identificarea microorganismelor interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, respectiv în eliberarea de siliciu solubil.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

- ✓ Materialul lignocelulozic micronizat folosit ca sursă unică de carbon și energie în mediul minimal este reprezentat de pulbere micronizată de: tulpini de porumb, *Zea mays*, sau paie de grâu, *Triticum aestivum*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac;
- ✓ Inocularea în condiții axenice a plăcii de testare și a plăcii martor se realizează prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini din oțel inox, a 10...20 μ l de inocul lichid, cu circa 10^6 ufc/ml, dintr-o placă cu 96 de godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat;
- ✓ Evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa cu un singur godeu se face prin tratare cu 10 ml soluție molibdat de amoniu, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 secunde, adăugare de 10 ml acid tartric 1,33 M după 10 minute și de 10 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min și incubare timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii;
- ✓ Evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa martor cu 96 godeuri se face prin tratare cu 0,1 ml soluție molibdat de amoniu, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 secunde, adăugare de 0,1 ml acid tartric 1,33 M după 10 minute și de 0,1 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min, și incubare timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Realizarea concomitentă a screening-ului pentru eliberarea speciilor de siliciu solubil din materialul vegetal și menținerea acestora în soluție și pentru interacția biologică între tulpini / izolate, respectiv antagonism, neutralism, mutualism,;



- Asigurarea statistică a experimentelor datorită utilizării unor scheme de testare randomizată, compatibile cu modelele de analiza varianței;
- Posibilitatea evidențierii interacțiilor dintre microorganisme care se dezvoltă în structuri de tip biofilm, similare celor naturale, datorită mediului hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer; în structurile de tip biofilm microorganismele prezintă rezistență sporită la factorii de mediu, inclusiv antagonism;
- Selectarea de tulpini care sunt utile atât pentru producerea de compuși utilizabili pentru desiliciere materialului vegetal destinat biorafinării, cu generarea de inputuri tehnologice conținând biosiliciu recuperat, cât și pentru tratamente în agricultură, ca biostimulanți microbieni, în special pentru tratamentul resturilor vegetale de pe sol în sistemele de agricultură conservativă.

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

Exemplul 1. 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, 10 g pulbere micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac, 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 realizează mai întâi mediul cu principalele săruri și pulberea micronizată de tulpini de porumb, se aduce pH la 7,4 cu NaOH.

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



Într-o placă Cellstar® OneWell Plate™ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania) se adaugă aseptice 63,2 ml de mediul minimal M9 – pulbere de tulpini de porumb - poloxamer, lichefiat la 4°C, pentru a forma un strat de mediu de cultură cu grosime de 8 mm. Mediu se lasă la temperatura camerei în condiții aseptice pentru a se încălzi și solidifica. Acest strat de mediu de cultură hidrogelificat cu poloxamer se inoculează axenic, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții. Inocularea se realizează cu mici cantități de inocul lichid, prelevat cu ajutorul unui replicator de inox cu 96 pini (Multi -Blot™ Replicator System, V&P Scientific, San Diego, CA, SUA), dintr-o placă cu 96 de godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat, conform celor descrise în continuare. Într-o placă cu 96 de godeuri se distribuie aseptice tampon fosfat salin steril, câte 225 μ l 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 10^7 ufc/ml. Din aceste culturi 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 de mai jos.

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

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

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

Placa inoculată se incubă timp de 60 - 120 ore, la temperaturi 30°C. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).



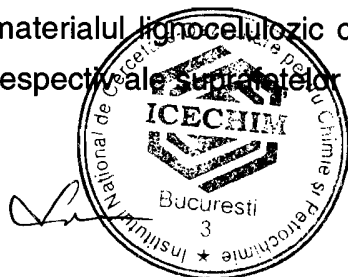
În paralel se realizează o placă martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat. Pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri cu fund plat (Corning® Costar® cell culture plates, Corning, NY, SUA), se distribuie câte 325 µl de mediu minimal M9 – pulbere de tulpini de porumb - poloxamer, pentru a forma un strat cu grosime de 8 mm. Cele 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, conform tab.1, se inoculează cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, care a fost în prealabil sterilizat prin flambare.

Plăcile martor cu 96 de godeuri, în care microorganismele inoculate se dezvoltă individual, fără a interacționa, se incubă timp de 60 - 120 ore, la aceeași temperatură ca și plăcile cu un singur godeu, în care microorganismele interacționează. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile coloniilor de microorganisme dezvoltate în fiecare godeu, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene).

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

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

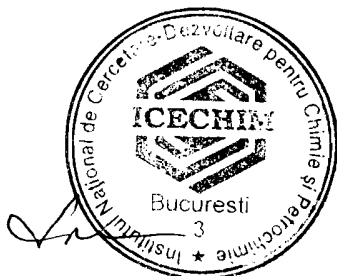
Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii se prelucrează cu ajutorul softului specializat, *open acces*, Colonyzer (Lawless *et al.* 2010, BMC Bioinformatics, 11, 287). Se obțin date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office, Microsoft, Redmond, WA, SUA), pentru dezvoltarea coloniilor și pentru formarea suprafeței colorate ca urmare a reacției speciilor de siliciu eliberate din materialul lignocelulozic cu acidul molibdenic. Se compară suprafețele coloniilor și, respectiv ale suprafețelor colorate, în proba cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite



randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție reciprocă, în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină / izolat de testat s-a dezvoltat separat. Se identifică prin analiza varianței (ANOVA, StatSoft - Dell Software, Tulsa, OK, SUA) microorganismele care interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, și respectiv în eliberarea de siliciu solubil din materialul lignocelulozic.

Exemplul 2. Se procedează ca în exemplu 1, numai că se folosește pulbere micronizată de paie de grâu, *Triticum aestivum*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac, ca unică sursă de carbon și energie în mediul minimal hidrogelifiat.

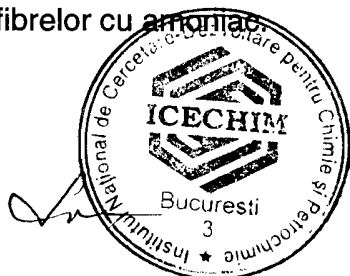
Această lucrare a fost realizată prin programul Parteneriate in domenii prioritare — PN II, derulat cu sprijinul MEN – UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0846, contract 159/2014 CERES”



REVENDICARI

1. Procedeu de selecție a consorțiilor de microorganism care eliberează și solubilizează biosiliciul din materialul vegetal **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu a unui mediu minimal sterilizat, cu o grosime de 8 mm, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat, ca unică sursă de carbon și energie, și care este hidrogelificat cu un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol; inocularea în condiții axenice a mediului minimal hidrogelificat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și incubarea timp de 60 - 120 ore, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme dezvoltate, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginii, din 12 în 12 ore; realizarea unei plăci martor, în care fiecare colonie din izolatele / tulpinile microbiene testate se dezvoltă separat, prin inocularea în condiții axenice, a celor 12 tulpini / izolate distribuite randomizat în 8 repetiții, într-o placă de microtitrare cu 96 godeuri, care conține în fiecare godeu aceeași grosime de mediul minimal hidrogelificat, cu 1 g la 100 ml material lignocelulozic micronizat ca unică sursă de carbon; incubarea timp de 60 - 120 ore, la 30°C, în condiții de aerobioză, a plăcii de microtitrare martor, cu prelevarea imaginii coloniilor de microorganisme, cu ajutorul unui sistem de prelevare a imaginilor, din 12 în 12 ore; evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa cu un singur godeu și în placa martor cu 96 godeuri și prelevarea imaginii plăcilor; analiza imaginilor prelevate cu ajutorul unor soft-uri specializate, compararea rezultatelor din proba cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, și care s-au dezvoltat în interacție reciprocă în placa cu un singur godeu, cu cele din placa martor, în care fiecare tulpină / izolat de testat s-a dezvoltat separat și identificarea microorganismelor interacționează reciproc, în dezvoltare, ca antagonism sau stimulare, respectiv în eliberarea de siliciu solubil.

2. Procedeu de selecție a consorțiilor de microorganism care eliberează și solubilizează biosiliciul din materialul vegetal conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** materialul lignocelulozic micronizat folosit ca sursă unică de carbon și energie în mediul minimal este reprezentat de pulbere micronizată de: tulpini de porumb, *Zea mays*, sau paie de grâu, *Triticum aestivum*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac.



3. Procedeu de selecție a consorțiilor de microorganism care eliberează și solubilizează biosiliciul din materialul vegetal conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** inocularea în condiții axenice a plăcii de testare și a plăcii martor se realizează prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini din oțel inox, a 10...20 μ l de inocul lichid, cu circa 10^6 ufc/ml, dintr-o placă cu 96 de godeuri, în care s-a realizat axenic în mediu lichid diluarea și randomizarea tulpinilor / izolatelor de testat;
4. Procedeu de selecție a consorțiilor de microorganism care eliberează și solubilizează biosiliciul din materialul vegetal conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa cu un singur godeu se face prin tratare cu 10 ml soluție molibdat de amoniu, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 secunde, adăugare de 10 ml acid tartric 1,33 M după 10 minute și de 10 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min și incubare timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii;
5. Procedeu de selecție a consorțiilor de microorganism care eliberează și solubilizează biosiliciul din materialul vegetal conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** evidențierea eliberării speciilor moleculare de siliciu solubil în placa martor cu 96 godeuri se face prin tratare cu 0,1 ml soluție molibdat de amoniu, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,06 M în acid sulfuric 1 M, cu o ușoară agitare timp de 20 secunde, adăugare de 0,1 ml acid tartric 1,33 M după 10 minute și de 0,1 ml soluție acid ascorbic 0,071 M după alte 10 min, și incubare timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii.

