



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00333**

(22) Data de depozit: **15/06/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2021 BOPI nr. **12/2021**

(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;**

• **CONSTANTINESCU - ARUXANDEI
DIANA, ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297,
BL.15A, SC.A, ET.1, AP.5, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **GĂLAN ANA MARIA, ȘOS.SĂLAJ, NR.349,
BL.1, SC.1, ET.5, AP.46, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PAULENCO ANCA, STR.SÂNDULEȘTI,
NR.1, BL.Z11, SC.1, ET.10, AP.66,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE BIOSINTEZĂ A SUSPENSIILOR STABILE
DE NANOPARTICULE DE SELENIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor suspensii stabile de nanoparticule biogene de seleniu zerovalent cu aplicabilitate ca biostimulanți pentru plante. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de realizare a unui mediu de cultură mixotrof pentru alge care include 2% vinasă de la fabricarea drojdiei de panificație, adăugarea aseptică a unei soluții de selenit de sodiu 10 mM, inocularea mediului cu o suspensie de microorganisme fotosintetizate, incubarea până la obținerea unei densități optice corespunzătoare acu-

mulării a 5 g la litru de mediu, ultrasonarea culturii de microorganisme fotosintetizate-nanoparticule de seleniu și separarea prin centrifugare a debriurilor celulare, omogenizarea supernatantului urmată de concentrare prin ultrafiltrare tangențială a suspensiei, până la o concentrație a nanoparticulelor de seleniu care determină o densitate optică la 600 nm DO600 de 0,4...0,8.

Revendicări: 5



PROCEDEU DE BIOSINTEZĂ A SUSPENSIILOR STABILE DE NANOPARTICULELE DE SELENIU

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor suspensii stabile de nanoparticule biogene de seleniu zerovalent, care sunt destinate în special aplicării ca biostimulanți pentru plante.

Sunt cunoscute diferite procedee pentru obținerea nanoparticulelor biogene de seleniu. Nanoparticulele de seleniu elementar (zerovalent), 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). Astfel de specii de seleniu acționează asupra plantelor de cultură ca biostimulanți anorganici (du Jardin, 2015, *Scientia Horticulturae*, 196: 3-14), pentru mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici, amplificării preluării și utilizării nutrienților și creșterii calității recoltei.

Deși se consideră că seleniul nu este un element esențial pentru plante, în ultimele decade s-a demonstrat că 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 factorii de stres biotici, agenți fitopatogeni (Hanson et al. 2003, *New Phytologist*, 159: 461-469) și dăunători (Mechora, 2019, *Plants*, 8, 262) și față de factorii de stres abiotici, inclusiv secetă (Ahmad et al. 2016, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 372-380) și amplifică asimilarea azotului și metabolismul compușilor azotați (Rios et al. 2010, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1914-1919).

Pentru tratamentul plantelor sunt utilizați compuși anorganici de seleniu. Speciile anorganice de seleniu au o toxicitate care scade în ordinea selenat > selenit > seleniură > seleniul elemental / zerovalent (Nuttall, 2006, *Annals of Clinical & Laboratory Science* 36: 409-420). În timp ce selenatul are o toxicitate acută 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 și mai redusă decât cea a seleniului elemental (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). SeMeSeCys este însă un 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). Iar nanoparticulele de seleniu au, așa cum s-a menționat deja, o toxicitate similară cu cea a seleniului zerovalent.

Producerea chimică a nanoparticulelor de seleniu implică utilizarea unor condiții dure și a 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). Biosinteza nanoparticulelor de seleniu se desfășoară în condiții blânde (Wadhwani 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).

Întrucât nanoparticulele de seleniu biosintetizate au avantaje evidente, au fost brevetate o serie de procedee de obținere prin biosinteză a nanoparticulelor de seleniu. Se ilustrează aici doar prin câteva procedee. Brevetul RU2717997 descrie un procedeu în care utilizează bifidobacterii *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 sau bacterii propionice *Propionibacterium freudenreichii* Sh85 pentru producerea de nanoparticule de seleniu. Mediul de cultivare este zer clarificat, iar sinteza nanoparticulelor se face după ce se adaugă 1-2 mg/l selenit de sodiu. Cererea de brevet CN 107881127 (A) protejează o tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens*, Lxz-41, depozitată cu numărul M2016578 la China Center for Type Culture Collection (CCTCC), și o metodă de preparare a nano-seleniului prin intermediul respectivei tulpini. Procedeu 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 adăugare continuă, recoltarea culturii, ultrasonicarea bacteriilor și separarea nanoparticulelor formate în 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), depozitată cu numărul M2013674 la China Center for Type Culture Collection (CCTCC). Tulpina are caracteristicile tipice ale selenobacteriilor și este revendicată inclusiv pentru producerea de nano-seleniu. Cererea de CA2723655A1 se referă la sinteza nanoparticulelor de seleniu de către diferite

microorganisme fotosintetizante, inclusiv *Chlamydomonas reinhardtii* (UTEX 90) și *Synechococcus leopoliensis* (UTEX 2434).

Nanoparticulele produse prin (bio)sinteză în medii biologice au avantajul de a își forma o coroană cu stabilitate mai ridicată încă din faza de (bio)sinteză. Această coroană formată încă din faza de (bio)sinteză amplifică proprietățile nanoparticulelor. De ex. nano-seleniu sintetizat în mediul de cultură al fungilor din genul *Trichoderma* are efecte antifungice mai bune și determină o inhibare mai pronunțată a producerii de micotoxine, de la *Alternaria* (83% TeA și 79% AOH), fumonisina B1 (63% FB1) și, respectiv, deoxinivalenol - 76% DON. (Hu *et al.* 2019, Food Control, 106, 106748). De asemenea nano-selenium biogen produs de ciupercile *Trichoderma* amplifică acțiunea acestor antagoniști față de făinarea produsă la mei, de *Sclerotinia graminicola* (Nandini *et al.* 2017, *Scientific reports* 7: 2612).

Un avantaj suplimentar al procedeelor de (bio)sinteză în medii biologice a nanoparticulelor este că aceste procedee sunt procedee "verzi", care nu implică temperaturi ridicate sau pH extrem. Totuși, datorită efectelor toxice ale seleniului, formarea nanoparticulelor de seleniu zerovalent se face mai ales cu metaboliții din mediile de cultură ale microorganismelor și nu prin biosinteză directă de către microorganisme. Spre deosebire de nanoparticulele sintetizate asistat de metaboliții din mediul de cultură a microorganismelor, care pot avea diferite forme și distribuții de dimensiune pe un domeniu larg, de 20-550 nm (Vetchinkina *et al.* 2019, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58, 17207-17218), nanoparticulele biosintetizate de către microorganisme au preponderent formă sferică, cu o distribuție mai restrânsă a dimensiunii nanoparticulelor (Diko *et al.* 2020. *Materials Chemistry and Physics*, 246, 122583). Iar coroana biopolimeri amfifili a nanoparticule biogene de seleniu zerovalent sintetizate asistat de către metaboliții din mediul de cultură al microorganismelor este în mod evident mai puțin dezvoltată decât cea a nanoparticulelor biogene de seleniu biosintetizate de către microorganisme (Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018, *Nutrients*, 10(10), 1466). O coroană de (bio)polimeri amfifili determină însă o stabilitate superioară a suspensiilor de nanoparticulelor biogene de seleniu zerovalent hidrofobe în medii apoase, datorită formării unui strat protector care stabilizează forțele sterice și electrostatice de respingere dintre nanoparticule (Zhang *et al.* 2019, *Biomaterials Science*, 7, 5112-5123, Tang *et al.* 2020. *Journal of Food Engineering*, 275, 109878).

Deși nanoparticulele biosintetizate de microorganisme sunt superioare celor sintetizate asistat de metaboliții din mediul de cultură al microorganismelor,

randamentul este scăzut, datorită toxicității seleniului, iar nanoparticulele de seleniu tind să se agrege la concentrare. Soluția cultivării microorganismelor pe medii în care se introduc treptat concentrații limitate de săruri de seleniu, prin adăugare continuă de mici cantități de săruri solubile de seleniu (brevet US 4530846) sau prin eliberare treptată, pe măsura consumării seleniului, din săruri insolubile (brevet RO 112117 B1) sau din complecși (brevet RO 116770 B1) nu este aplicabilă pentru sinteza de nanoparticule de seleniu. Nanoparticulele de seleniu sunt sintetizate de microorganisme pentru a detoxifia concentrațiile mari de seleniu din mediul lor de creștere (Wadhwani et al. 2016, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2555-2566), deci concentrațiile mici ar fi asimilate și nu reduse la seleniu zerovalent.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de biosinteză a nanoparticulelor de seleniu prin care să se reducă toxicitatea metabolică a sărurilor de seleniu și prin care să fie favorizată biosinteza de nanoparticule cu coroană de (bio)polimeri amfifili.

Soluția tehnică este de a realiza biosinteza suspensiilor de nanoparticule de seleniu zero-valent într-un mediu în care s-a adăugat vinasă rezultată de la fabricarea drojdiei de panificație. Autorii au descoperit că adăugarea de vinasă de la fabricarea drojdiei de panificație reduce toxicitatea seleniului și favorizează formarea de suspensii de nanoparticule de seleniu stabile.

Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Realizarea unui mediu de cultură cu următoarea compoziție: 10 g/L zer praf cu min. 12% proteină și min. 72% lactoză; 2% vinasă de la fabricarea drojdiei de panificație; NaHCO_3 16,80 g/L; K_2HPO_4 0,50 g/L; NaNO_3 1,875 g/L; K_2SO_4 1,00 g/L; NaCl 1,00 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g/L, Soluție de microelemente 1 mL/L; Soluție de Fe chelatată 5 mL/L.
- Adăugarea aseptică a unei soluții de selenit de sodiu 10 mM, sterilizată prin ultrafiltrare pe filtru de 0,2 μm , în raport de 10 ml soluție selenit la 90 ml mediu;
- Inocularea mediului cu o suspensie de microorganisme fotosintetizante, cu un conținut cuprins între 10^8 și 10^9 microorganisme viabile per mL, în raport de 1 mL suspensie inoculantă la 11 ml mediu;
- Incubarea culturii de microorganisme fotosintetizante la temperatura de 28-30°C; iluminare 250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu o fotoperioadă / alternanță ciclu iluminare - întuneric de 12:12 ore; administrare de amestec sintetic de gaze cu compoziția: 7% CO_2 , 14% O_2 și 79% N_2 la un debit de 30 mL/min, corespunzând la o aerare cu 1 litru de amestec

gazos cu 7% CO₂ pe min pe 100 litri de mediu, până la atingerea unei densități optice corespunzătoare acumulării a 5 g la litru de mediu;

- Ultrasonarea culturii de microorganisme fotosintetizante – nanoparticule de seleniu timp de 10 min la frecvența de 20 kHz și la o putere de 300 W și de separarea prin centrifugare la 2500xg a debriurilor celulare;
- Omogenizarea supernatantului prin microfluidizare, 10 cicluri la 1500 bari, urmată și concentrare prin ultrafiltrare tangențială pe membrană de 0,1 μm a suspensiei de nanoparticule, până la o concentrație a nanoparticulelor de seleniu care determină o densitate optică la 600 nm, DO₆₀₀, de 0,8.

Vinasa de la fabricarea drojdiei de panificație utilizată are un conținut 15±1,4% betaină, 3,0± 0.2% azot total, 0,5± 0,1% fosfor total, 7 ± 0,3% potasiu total.

Soluția stoc de micronutrienți conține următoarele cantități, exprimate în g/L: H₃BO₃, 2,860; MnSO₄ · 4H₂O, 2,030; ZnSO₄ · 7H₂O 0,222; MoO₃ (85%) 0,018; Cu SO₄ · 5H₂O 0,079; Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0,494.

Soluția stoc de Fe chelatat se prepară după cum urmează: se dizolvă în 80 ml de apă distilată 0,69 g de FeSO₄ · 7H₂O și 0,93g Na₂EDTA, se aduce la fierbere soluția și se menține timp de 5 min la fierbere, se răcește la temperatura camerei și se aduce la volum final de 100 ml.

Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Accelerează metabolizarea seleniului întrucât betaina, ingredientul major al vinasei, favorizează regenerarea adenosil-S-metioninei, donorul de metil implicat în conversia sărurilor de seleniu în (metil)selenoaminoacizi ;
- ✓ Melanoidinele amfifile din componența vinasei stabilizează suplimentar nanoparticulele de seleniu sintetizate de către microorganisme;
- ✓ Potențează acțiunea biostimulantă asupra plantelor de cultură prin asocierea nanoseleniului cu betaină.

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

Exemplu 1. Se prepară 2,5 litri de mediu cu următoarea compoziție: 10 g/L zer praf cu min. 12% proteină și min. 72% lactoză; 2% vinasă de la fabricarea drojdiei de panificație; NaHCO₃ 16,80 g/L; K₂HPO₄ 0,50 g/L; NaNO₃ 1,875 g/L; K₂SO₄ 1,00 g/L; NaCl 1,00 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 0,20 g/L; CaCl₂ · 2H₂O 0,04 g/L, Soluție de microelemente 1 mL/L; Soluție de Fe chelatat 5 mL/L. Vinasa de la fabricarea drojdiei de panificație utilizată are un conținut 15±1,4% betaină, 3,0± 0.2% azot total, 0,5± 0,1%

fosfor total, $7 \pm 0,3\%$ potasiu total. Soluția stoc de micronutrienți conține următoarele cantități, exprimate în g/L: H_3BO_3 , 2,860; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,030; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222; MoO_3 (85%) 0,018; $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,494. Soluția stoc de Fe chelatat se prepară după cum urmează: se dizolvă în 80 ml de apă distilată 0,69 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 0,93g Na_2EDTA , se aduce la fierbere soluția și se menține timp de 5 min la fierbere, se răcește la temperatura camerei și se aduce la volum final de 100 ml. Mediul se sterilizează la 121°C , timp de 30 min. În mediul steril se adăugă aseptice o soluție de selenit de sodiu 10 mM, sterilizată prin filtrare pe filtru de $0,2 \mu\text{m}$, în raport de 10 ml soluție selenit la 90 ml supernatant, respective 250 mL. Cei 2,75 litri de mediu steril se introduc într-un fotobioreactor Biostat PBR 2S (Sartorius Stedim Biotech).

Mediul de creștere se inoculează cu 250 ml de inocul din cultură de microorganisme fotosintetizante, tulpina *Nannochloris* sp 424-1, depusă sub numărul CCAP 251/10 în Colecția de culturi de alge și protozoare (CCAP), min. 10^9 ufc/ml. Condiții de creștere în fotobioreactor sunt volumul de mediu: 3 L; temperatura de lucru: 28°C ; iluminare $250 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu o fotoperioadă / alternanță ciclu iluminare : întuneric de 12:12 ore; administrare de amestec sintetic de gaze cu compoziția: 7% CO_2 , 14% O_2 și 79% N_2 la un debit de 30 ml/min, corespunzând la o aerare cu 1 litru de amestec gazos cu 7% CO_2 pe min pe 100 litri de mediu; viteza pompei de recirculare a pompei peristaltice 70%, respectiv un debit de recirculare de 3500 ml/min; se programează din softul bioreactorului măsurarea automată a parametrilor de lucru respectiv: pH, turbiditate (OD), temperatură, lumină, viteza de recirculare, debit de CO_2 / aerare cu amestec sintetic de gaze.

Se incubă până la atingerea unei densități optice corespunzătoare acumulării a 5 g la litru de mediu. Suspensia recoltată se ultrasonează prin introducerea unei sonde cu diametrul de 10 mm la o adâncime de 5 cm în soluția de procesat și aplicarea de ultrasunete pentru 10 min la o frecvență de 20 kHz și la o putere de 300 W. Se trec microalgele dezagregate, împreună cu mediul de cultură în 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 câte 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 $2500 \times g$.

Supernatantul rezultat, în care sunt incluse nanoparticulele de seleniu, se omogenizează prin microfluidizare (LM20 Microfluidizer, Microfluidics, Westwood,

MA), 10 cicluri la 1500 bari. Omogenatul se concentrează până la DO_{600} de 0,8 prin ultrafiltrare tangențială pe un sistem de ultrafiltrare tangențială Prostack (Merck Group, Darmstad, Germania), prevăzut cu o membrană de 0,1 μm din polisulfonă hidrofilă.

Nanoparticulele din suspensia rezultată sunt analizate prin împrăștierea dinamică a luminii (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, Malvern, Marea Britanie) și prin electronmicroscopie de transmisie (Tecnai™ G2 F20 TWIN, FEI – Thermo Fisher, Hillsboro, OR, SUA). Se obțin nanoparticule de seleniu sferice, cu o valoare medie a dimensiunii de 142 ± 47 nm, și o valoare a potențialului zeta de $-23,2$ mV.

Exemplul 2. Se lucrează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se folosește tulpina *Chlorella homosphaera*, depozitată sub numărul CCAP 211/121, în Colecția de culturi de alge și protozoare (CCAP). Incubarea tulpinii se realizează la 30°C . Se obțin nanoparticule de seleniu sferice, cu o valoare medie a dimensiunii de 135 ± 42 nm și o valoare a potențialului zeta de $27,4$ mV.

Exemplu 3. Se lucrează la fel ca în Exemplu 1, cu următoarele diferențe. Nu se mai introduce vinasă în mediul de cultură al algelor. Nu se poate realiza concentrarea prin ultrafiltrare tangențială până la DO_{600} de 0,8 pentru că nanoparticulele de seleniu precipită. Se limitează concentrarea până la DO_{600} de 0,4. Nanoparticulele nu sunt sferice, ci pseudosferice, și nu li se poate determina dimensiunea exactă. Valoarea potențialului zeta este crescută la $-2,4$ mV.

Exemplu 4. Se lucrează la fel ca în Exemplu 2, cu următoarele diferențe. Nu se mai introduce vinasă în mediul de cultură al algelor. Nu se poate realiza concentrarea prin ultrafiltrare tangențială până la DO_{600} de 0,8 pentru că nanoparticulele de seleniu precipită. Se limitează concentrarea până la DO_{600} de 0,5. Nanoparticulele sunt sub formă de nanobaghet. Valoarea potențialului zeta este crescută la $-4,7$ mV.

Exemplul 5. A fost determinat efectul tratamentelor foliare cu nanoparticule realizate conform Exemplele 1-4 asupra inducerii enzimelor specifice răspunsului de apărare din plantele de grâu. Plante de grâu (*Triticum aestivum* L. cv. Pajura) au fost cultivate în condiții de cameră climatică (Economic Lux, Snijders Labs, Tilburg, Olanda), în tăvi cu 4 kg conținând un substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV, Oosterhout, Olanda). Tăvile au fost menținute la $22 \pm 2^\circ\text{C}$ în timpul perioadei de lumină și la $17 \pm 2^\circ\text{C}$ în timpul perioadei de întuneric, cu o fotoperioadă de 12 ore, cu o iluminare cu intensitatea de 360 mE/m²/s, provenită din tuburi cu neon. Substratul

conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele nu au fost fertilizate. Umiditatea în tăvi a fost menținută prin udare zilnică. După 21 zile de la germinare au fost aplicate tratamente cu suspensii de nanoparticule de seleniu, diluate la echivalent $DO_{600} = 0,2$ și aplicate într-o doză echivalentă la 20 mL/m^2 . Aplicarea s-a realizat prin stropire, cu un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Helathcare, Somerset, PA, SUA). La două săptămâni de la aplicare s-au prelevat plantele de grâu, în care s-a determinat activitatea enzimelor specifice inducerii răspunsului de apărare pe calea acidului salicilic, SA (peroxidază, EC 1.11.1.7, polifenoloxidaza, EC 1.10.3.1) (Kang și Guo 2014, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 2287-2297) și pe calea acidului jasmonic, JA (lipoxigenază E.C. 1.13.11) (Motallebi et al. 2015, *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 1-11).

Frunzele de grâu au fost mojarate în prezența azotului lichid, La $0,2 \text{ g}$ frunze mojarate s-au adăugat 10 ml de tampon fosfat ($0,1 \text{ mol}$, pH-ul 6.1) După agitare pentru o oră la frigider, soluția a fost centrifugat la 13.000 g timp de 15 minute , la 4°C . Supernatantele (extractele enzimatic) au fost apoi utilizate pentru determinarea activității diferitelor oxidaze, induse diferențiat pe calea SA sau JA. Activitățile peroxidazei, POx, și polifenoloxidazei, PPO, au fost determinate spectrofotometric, prin creșterea densității optice (DO), DO_{470} și, respectiv, DO_{420} . Substraturile utilizate pentru POx și PPO au fost guaiacol / H_2O_2 , și respectiv, catecol. $0,3 \text{ ml}$ de extract s-au adăugat peste $1,7 \text{ ml}$ de substrat 1 mM în tampon $0,1 \text{ M}$ Tris-HCl, pH 7.8 . (Gomes et al. 2005, *Scientia Agricola*, 62: 547-551). Activitatea LOx a fost măsurată la 234 nm . Soluția de substrat care conținea acid linoleic (Sigma, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, SUA) a fost pregătită conform metodei Bohland et al. 1997 (*Plant Physiology*, 114: 679-685), purtată cu azot și stocată la -20°C , în părți alicote. Pentru determinarea activității LOx s-au diluat $60 \mu\text{l}$ de extract la 1 ml de tampon fosfat-citrat $0,1 \text{ M}$, pH 6.2 , s-a adăugat $0,1 \text{ ml}$ de soluție substrat, și s-a incubat timp de 15 min la 30°C .

Citirile pentru determinarea activității POx și PPO au fost efectuate în modul dinamic, în fiecare secundă, timp de 2 minute pe un spectrofotometru CLARIOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Germania). Activitățile enzimatic au fost exprimate în unități per gram de substanță proaspătă (U/g). O unitate enzimatică POx și PPO a fost definită ca fiind acea cantitate de enzimă care determină o creștere de 0.1 unități DO per minut per ml de extract. O unitate enzimatică LOx este acea cantitate de enzimă care determină o creștere a absorbantei cu $0,001$ unități per minut per ml de extract. Martorii de reactivi utilizați ca referință pentru citirile spectrofotometrice au fost tampoanele de extracție și de reacție. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tab. 1. Activitatea enzimelor specifice inducerii răspunsului de apărare pe calea acidului salicilic (peroxidază, POx, polifenoloxidaza, PPO) și pe calea acidului jasmonic (lipoxigenază LOx) în plantele de grâu tratate cu nanoparticule de seleniu.

Varianta experimentală	Activitatea POx (U/g substanță proaspătă)	Activitatea POx (U/g substanță proaspătă)	Activitatea POx (U/g substanță proaspătă)
Martor, netratat cu nanoparticule de seleniu	127 ± 27c	137 ± 25c	15 ± 3b
Sol tratat cu nanoparticule de seleniu conf. Ex.1, DO600 = 0,2, doză echivalentă la 20 mL/m ²	241 ± 29a	256 ± 24a	28 ± 3a
Sol tratat cu nanoparticule de seleniu conf. Ex.2, DO600 = 0,2, doză echivalentă la 20 mL/m ²	234 ± 35a	241 ± 28a	31 ± 3a
Sol tratat cu nanoparticule de seleniu conf. Ex.3, DO600 = 0,2, doză echivalentă la 20 mL/m ²	161 ± 32b	171 ± 35b	21 ± 3b
Sol tratat cu nanoparticule de seleniu conf. Ex.4, DO600 = 0,2, doză echivalentă la 20 mL/m ²	167 ± 24b	152 ± 41bc	17 ± 5bc

Rezultatele obținute demonstrează o inducerea echilibrată a răspunsului de apărare din plantele de grâu, sub acțiunea tratamentului foliar realizat cu nanosuspensii de seleniu realizate conform Exemplu 1 și Exemplu 2.

Revendicări

1. Procedeu de biosinteză a suspensiilor stabile de nanoparticulele de seleniu, conform invenției, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: realizarea unui mediul de cultură cu următoarea compoziție: 10 g/L zer praf cu min. 12% proteină și min. 72% lactoză; 2% vinasă de la fabricarea drojdiei de panificație; NaHCO_3 16,80 g/L; K_2HPO_4 0,50 g/L; NaNO_3 1,875 g/L; K_2SO_4 1,00 g/L; NaCl 1,00 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g/L, Soluție de microelemente 1 mL/L; Soluție de Fe chelatat 5 mL/L; adăugarea aseptică a unei soluții de selenit de sodiu 10 mM, sterilizată prin ultrafiltrare pe filtru de 0,2 μm , în raport de 10 ml soluție selenit la 90 ml mediu; inocularea mediului cu o suspensie de microorganisme fotosintetizante, cu un conținut cuprins între 10^8 și 10^9 microorganisme viabile per mL, în raport de 1 mL suspensie inoculantă la 11 ml mediu; incubarea culturii de microorganisme fotosintetizante la temperatura de 28-30°C; iluminare 250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, cu o fotoperioadă / alternanță ciclu iluminare - întuneric de 12:12 ore; administrare de amestec sintetic de gaze cu compoziția: 7% CO_2 , 14% O_2 și 79% N_2 la un debit de 30 mL/min, corespunzând la o aerare cu 1 litru de amestec gazos cu 7% CO_2 pe min pe 100 litri de mediu, până la atingerea unei densități optice corespunzătoare acumulării a 5 g la litru de mediu; ultrasonarea culturii de microorganisme fotosintetizante – nanoparticule de seleniu timp de 10 min la frecvența de 20 kHz și la o putere de 300 W și de separarea prin centrifugare la 2500xg a debriurilor celulare; omogenizarea supernatantului prin microfluidizare, 10 cicluri la 1500 bari, urmată și concentrare prin ultrafiltrare tangențială pe membrană de 0,1 μm a suspensiei de nanoparticule, până la o concentrație a nanoparticulelor de seleniu care determină o densitate optică la 600 nm, DO_{600} , de 0,8.
2. Procedeu de biosinteză a suspensiilor stabile de nanoparticulele de seleniu, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că vinasă de la fabricarea drojdiei de panificație utilizată are un conținut $15 \pm 1,4\%$ betaină, $3,0 \pm 0,2\%$ azot total, $0,5 \pm 0,1\%$ fosfor total, $7 \pm 0,3\%$ potasiu total.
3. Procedeu de biosinteză a suspensiilor stabile de nanoparticulele de seleniu, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că soluția stoc de micronutrienți conține următoarele cantități, exprimate în g/L: H_3BO_3 , 2,860; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,030; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222; MoO_3 (85%) 0,018; $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,494.

4. Procedeu de biosinteză a suspensiilor stabile de nanoparticulele de seleniu, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că soluția stoc de Fe chelatat se prepară după cum urmează: se dizolvă în 80 ml de apă distilată 0,69 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 0,93g Na_2EDTA , se aduce la fierbere soluția și se menține timp de 5 min la fierbere, se răcește la temperatura camerei și se aduce la volum final de 100 ml.
5. Procedeu de biosinteză a suspensiilor stabile de nanoparticulele de seleniu, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că microorganismele fotosintetizante folosite sunt: *Nannochloris* sp 424-1 CCAP 251/10 și *Chlorella homosphaera* CCAP 211/121.