



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01384

(22) Data de depozit: 21.12.2010

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU PROTEȚIA
PLANTELOR, BD. ION IONESCU DE LA
BRAD NR. 8, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PETEU ȘERBAN FLORIN,
ȘOS. COLENTINA NR. 31, BL. R48, SC. A,
ET. 3, AP. 15, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU TRIEREA
IZOLATELOR DE MICROORGANISME ANTAGONISTE
FITOPATOGENILOR ȘI DISPOZITIV PENTRU REALIZAREA
ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de înalt randament pentru trierea izolatelor de microorganisme antagoniste fitopatogenilor, destinat identificării rapide a tulpinilor microbiene utilizabile ca ingrediente active în bio(produse) pentru protecția plantelor, și la un dispozitiv pentru realizarea acestui procedeu. Procedeu asigură trierea izolatelor de microorganisme prin urmărirea reacției unui grup de agenți fitopatogeni, a unor antagoniști reprezentativi pentru microbiocenozele țintă, rizosferă și filosferă, și a plantei gazdă, atunci când sunt expuse la compuși care difuzează, proveniți din culturile

mai multor izolate testate, prin monitorizarea a doi parametri fiziologici, corelabili, care sunt determinați prin metode diferite. Dispozitivul pentru realizarea procedurii include o variantă integrată și miniaturizată, în care senzorul electrochimic de oxigen și cei optochimici pentru bioxid de carbon, sub formă de spoturi de coloranți fluorescenți, sunt preparați prin tehnica strat peste strat, într-o singură structură, și depuși în fiecare godeu.

Revendicări: 2
Figuri: 4



W

PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU TRIEREA IZOLATELOR DE MICROORGANISME ANTAGONISTE FITOPATOGENILOR ȘI DISPOZITIV PENTRU REALIZAREA ACESTUIA

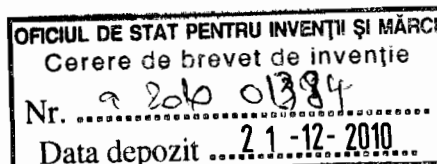
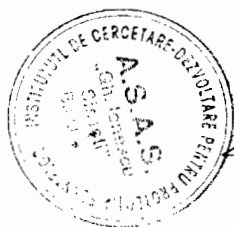
Prezenta invenție se referă la un procedeu de înalt randament pentru trierea izolatelor de microorganisme antagoniste fitopatojenilor, destinat identificării rapide a tulpinilor microbiene utilizabile ca ingrediente active în (bio)produse de protecția plantelor și la un dispozitiv pentru realizarea acestui procedeu.

Sunt cunoscute o serie de procedee utilizate pentru trierea (*screening-ul*) izolatelor de microorganisme în vederea identificării celor care prezintă capacitate de a proteja plante de cultură față de fitopatogeni. Tehnica cea mai larg răspândită este cea a culturilor duble, introdusă inițial de Morton și Strube (1955, *Phytopathology* 45, 419-420) și descrisă într-un mod specific și revendicată în brevetul SUA 4647533, pentru screening-ul preliminar al izolatelor de cu activitate antagonică față de *Pythium* spp. Această tehnică este consumatoare de timp și generează o serie de rezultate eronate, pentru că utilizează același mediu de cultură pentru diferite specii de microorganisme testate (fitopatogene sau antagoniste) și implică interacția dintre forme mobile, planctonice, de microorganisme (în natură microorganismele existând mai ales sub forme sesile, incluse în biofilme, cu o rezistență mărită la diferiții factori de mediu, inclusiv față de antagoniști).

Având în vedere că efectul antagonist implică de obicei biosinteza unor compuși antimicrobieni difuzibili tehnica culturilor duble a fost înlocuită uneori prin tehnica adăugării de supernatante, provenite din culturi de izolate potențial antagoniste și sterilizate de obicei prin ultrafiltrare, în mediile de cultură agarizate ale fitopatojenilor. Această tehnică înlătură dezavantajul cultivării microorganismelor diferite pe același mediu de cultură.

Procedeele descrise mai sus prezintă dezavantajul testării exclusive a unei singure perechi antagonist - fitopatogen, în experimente care durează zile.

Cererea de brevet SUA 2007/0148725 descrie un ansamblu de doi biosenzori, rezultați prin asocierea unui traductor de oxigen cu microorganisme (un fitopatogen și un antagonist) imobilizate și un procedeu care destinat screeningului antagoniștilor față de microorganismele fitopatogene din sol. Procedeu permite testarea unui extract dintr-un mediu al unui izolat microbial dat, concomitent față de două microorganisme, un antagonist și un fitopatogen, iar timpul de testare este de ordinul orelor. Procedeu prezintă însă o serie de dezavantaje. Microorganismele utilizate în realizarea biosenzorilor sunt



imobilizate, dar nu în structuri similare biofilmelor întâlnite uzual în mediile naturale. Interacția este limitată la 3 parteneri (izolatul din al cărui mediu de cultură se face extractul de testat, o tulpină de fitopatogen și o tulpină de antagonist) și nu include planta gazdă. Biosenzorii exprimă rezultatul ca pe o diferență de consum de oxigen rezultată ca urmare a introducerii extractului de testat, de preferință de 2 ori mai mare pentru antagonist comparativ cu fitopatogen, dar această diferență de consum poate fi datorată și unor reacții enzimatiche de peroxidare (implicate în biodegradarea compușilor anti-microbieni) și nu neapărat stimulării microorganismelor (reliefață ca o creștere a consumului de oxigen). Procedul de triere se referă numai la antagoniștii față de (ciupercile) fitopatogeni de sol (din rizosfera plantelor) și nu și la agenții fitopatogeni din filosferă.

De asemenea procedul descris nu selectează decât microorganisme care interacționează prin intermediul unor compuși difuzibili prin membrane de tipul antibioticelor sau compușilor biostimulanți. Microorganismele utilizate în combaterea biologică a agenților fitopatogeni prezintă mai multe tipuri de mecanisme de acțiune în afara antibiozei, respectiv competiția pentru nutrienți, (mico)parazitismul și sau (mico)prădarea, interferența cu semnalele implicate în comunicarea dintre microorganisme și/sau microorganisme și plante. Procedul descris prin cererea de brevet SUA 2007/0148725 se adresează exclusiv microorganismelor care au ca mecanism de acțiune antibioza și nu evidențiază microorganisme cu activitate de combatere biologică a fitopatogenilor care au alte mecanisme de acțiune.

La modul cel mai general în toate procedeele de screening *in vitro* descrise mai sus nu este luată în considerare interacția cu planta gazdă. Pentru înlăturarea acestor dezavantaje brevetul WO 91/05475 propune un procedu care implică: adăugarea unui strat de nisip umed într-un recipient închis; sterilizarea nisipului și a recipientului prin autoclavare; plasarea probei de sol în condiții aseptice peste stratul de nisip; semănarea unei semințe de plantă susceptibilă la agentul patogen testat; crearea de condiții favorizante pentru dezvoltarea fitopatogenilor; urmărirea germinării semințelor și dezvoltării plantulelor și în final recuperarea plantelor sănătoase și izolarea din rădăcinuțe a microorganismelor antagoniste. Tehnica descrisă este laborioasă, dificil de transformat într-un procedu de înalt randament și poate fi utilizată exclusiv pentru antagoniștii ciupercilor fitopatogene de sol care produc căderea plantulelor (din genurile *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedu de înalt randament pentru trierea izolatelor de microorganisme antagoniste,



H. H. H. H. H.

utilizabil atât pentru fitopatogenii de rizosferă, cât și pentru cei din filosferă, în care este urmărită concomitent reacția unui grup de agenți fitopatogeni, a unor antagoniști reprezentativi pentru microbiocenozele țintă, rizosferă și filosferă, și a plantei gazdă, atunci când sunt expuse la un compus difuzibil proveniți din culturile mai multor izolate testate, prin monitorizarea a doi parametri fiziologici corelabili care sunt determinați prin metode diferite. Procedul asigură dezvoltarea microorganismelor sub formă de biofilm și permite aplicarea unor tehnici de evidențiere și a mecanismelor care implică competiția pentru nutrienți, (mico)parazitismul, interferența cu semnalele implicate în comunicarea dintre microorganisme și/sau microorganisme și plante.

Procedeu de înalt randament pentru trierea izolatelor de microorganisme antagoniste fitopatogenilor constă în următoarele etape:

- Fabricarea de senzori de oxigen electrochimici pe substrat flexibil și de senzori optochimici fluorescenți pentru bioxid de carbon, fixarea câte unui senzor de oxigen și a unui senzor de bioxid de carbon fluorescent pe substrat de plastic transparent, în fiecare godeu dintr-o placă de microtitrare cu 24 godeuri, în care baza fiecărui godeu este reprezentată de o membrană de policarbonat, permeabilă particulelor $> 0,1 \mu\text{m}$, $> 500 \text{ kD}$ și realizarea de conexiuni la instrumentele de măsură a semnalele produse de senzori în funcție de concentrația de oxigen, respectiv bioxid de carbon, din godeul monitorizat;
- Alternativ, pentru o placă de titrare cu 96 godeuri, fabricarea unei variante *integrate și miniaturizate*, în care senzorul electrochimic de oxigen, cel(e) optochimic(e) pentru bioxid de carbon, sub formă de spoturi de coloranți fluorescenți, împreună cu membrana micro-poroasă care reprezintă baza godeului, sunt preparate prin tehnica strat-pestestrat, prin printari succesive pe o membrană semipermeabilă $> 0,1 \mu\text{m}$, $> 500 \text{ kD}$, iar structura flexibilă cu forma complexă se atasază la peretele interior vertical, la partea conică a fiecărui godeu, și respectiv fixată orizontal la interiorul aceluși godeu.
- Ambalarea în pungi termosudabile de polietilenă de înaltă densitate, și sterilizarea prin iradiere gamma, la o doză de 25 kGy , a plăcilor cu 24...96 godeuri, cu senzorii fixați în fiecare godeu;
- Realizarea unei scheme de testare, randomizată în dreptunghi latin, cu 6 variante în 4 repetiții pentru placa de 24 godeuri, incluzând: 2 variante cu microorganisme fitopatogene specifice unei plante gazdă, 1 variantă cu microorganism antagonist larg răspândit, 1 variantă cu plantule gazdă,



H. Heseu

obținute în condiții gnotobiotice și 2 variante tulpini de testat, și aplicarea acestei scheme de randomizare pentru placa de 24 godeuri;

- Realizarea unei scheme de testare, randomizată în dreptunghi latin, cu 12 variante în 8 repetiții pentru placa de 96 godeuri, incluzând: 3 variante cu microorganisme fitopatogene specifice unei plante gazdă, 2 variante cu microorganisme antagoniste larg răspândit, 1 variantă cu celule de plante gazdă, obținute în condiții axenice, 6 variante cu tulpini de testat și aplicarea acestei scheme de randomizare pentru placa de 96 godeuri;
- Prepararea de medii lichide specifice pentru diferitele microorganisme de testat, hidrogelifierea lor prin depunerea unor pelete de Poloxamer 409 în proporție de 40% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare, omogenizarea mediilor lichide reci, sterilizarea mediilor prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, răcirea mediilor pentru lichefiere până la 4°C;
- Prepararea unui mediu nutritiv mineral pentru plante, hidrogelifierea lui prin depunerea unor pelete de poloxamer 409 în proporție de 30% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare, omogenizarea mediului lichid rece, sterilizarea mediului prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, răcirea mediului pentru lichefiere până la 4°C, depunerea aseptică a 2,5 ml mediu nutritiv mineral hidrogelifiat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu al unei plăci corespunzătoare repetițiilor pentru varianta plantulă mediu de cultură și adăugarea aseptică a unor plantule de 5 zile din planta gazdă, provenite prin germinare din semințe dezinfectate și creștere într-un sistem gnotobiotic;
- Alternativ pentru placa cu 96 godeuri prepararea unui mediu Murashige-Skoog, hidrogelifierea lui prin depunerea unor pelete de poloxamer 409 în proporție de 30% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare, omogenizarea mediului lichid rece, sterilizarea mediului prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, răcirea mediului pentru lichefiere până la 4°C, depunerea aseptică a 0,3 ml de mediu steril hidrogelifiat Murashige-Skoog și adăugarea aseptică a 0,1 ml de suspensie de cultură meristematică conținând 10^2 celule vegetale din plantele gazdă;
- Incubarea plăcilor cu medii cu plantule gazdă / celule vegetale într-o cameră de creștere plante, timp de 48 ore, termostată la o temperatură de 25°C, cu o rată de iluminare de $120 \mu\text{moli fotoni m}^2 \text{s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 12 ore pe zi;



H. H. H. H. H.

- inocularea aseptică a 7,5 ml de mediu specific fiecărui microorganism hidrogelifiat la 4°C, cu 2,5 ml dintr-o suspensie având o densitate de 10^5 ufc/ml microorganisme de testat în mediu lichid specific corespunzător, depunerea aseptică a 2,4 ml mediu hidrogelifiat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu al unei plăci cu 24 de godeuri, conform schemei de randomizare care include variantele cu microorganisme fitopatogene, antagoniste și tulpinile de testat;
- Alternativ pentru placa cu 96 godeuri inocularea aseptică a 2,1 ml de mediu hidrogelifiat la 4°C, cu 0,7 ml dintr-o suspensie având o densitate de 10^5 ufc/ml microorganisme de testat în mediu lichid specific corespunzător, depunerea aseptică a 0,3 ml mediu hidrogelifiat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri, conform schemei de randomizare care include variantele cu microorganisme fitopatogene, antagoniste și tulpinile de testat.
- Incubarea plăcilor cu plantule gazdă / celule vegetale, microorganisme fitopatogene, antagoniste și tulpinile de testat, timp de 24 ore, la o temperatură de 25°C, cu o rată de iluminare de $120 \mu\text{moli fotoni m}^2 \text{s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 12 ore pe zi;
- Înlăturarea foliei protectoare de pe fundul plăcii cu 24 sau 96 de godeuri și așezarea aseptică a plăcii într-un recipient paralelipipedic steril, cu dimensiuni ale bazei apropiate de cele ale plăcii de microtitrare, cu margini etanșeizate cu șnur de cauciuc siliconic și prevăzut cu umeri de fixare a bazei plăcii;
- Introducerea de tampon fosfat salin steril în recipientul de bază, termostatarea întregului sistem prin introducerea într-un vas termostatat cu apă la 25°C, conectarea sistemului de senzori de monitorizare oxigen la un aparat de măsură specific, potențostat multicanal, stabilizarea semnalului senzorilor și monitorizarea acestuia;
- Monitorizarea producerii de bioxid de carbon prin determinarea fluorescenței fluorosenzorilor specifici;
- Prelucrarea semnalelor senzorilor de oxigen și bioxid de carbon, corelarea acestora, analiza statistică a rezultatelor și evidențierea izolatelor care au determinat reducerea la 50% a respirației unor tulpini de fitopatogeni, fără a reduce respirația celulelor plantei gazdă și/sau a microorganismelor antagoniste;
- Realizarea de determinări ulterioare pentru evidențierea unor compuși implicați în micoparazitism, cum sunt chitinazele / N-acetilglucosaminidazele,



Haese

- Realizarea de determinări ale cantității de biofilm format, care este în directă corelație cu semnalele implicate în comunicarea dintre microorganisme și/sau microorganisme și plante, și cu compușii care interferă cu aceștia, printr-o mică modificare a procedurii, respectiv înlăturarea foliei protectoare de pe fundul plăcii cu 24 de godeuri înainte de incubarea separată timp de 24 de ore a tulpinilor de microorganisme, și expunerea la compușii difuzibili care interferă comunicarea de grup / quorum sensing la microorganisme.
- Folosirea unor medii de cultură minimale pentru microorganisme, mimetice pentru o serie de microbiocenoze naturale, pentru a selecta izolatele care prezintă competiția pentru nutrienți.

Dispozitiv pentru aplicarea invenției, care include o variantă integrată și miniaturizată, în care senzorul electrochimic de oxigen și cel(e) optochimic(e) pentru bioxid de carbon, sub forma de spoturi de coloranți fluorescenți, sunt preparați prin tehnica strat - peste - strat, prin printări succesive pe un substrat flexibil și transparent reprezentant de membrana semipermeabilă 0,1 μm , structura flexibilă cu forma complexă rezultată se atașează la peretele interior vertical, la partea conică a fiecărui godeu, și respectiv fixată orizontal la interiorul fiecărui godeu dintr-o placă de microtitrare cu 96 godeuri, iar marginea a de jos a pereților godeurilor este sudată de partea fixată orizontal a structurii flexibile cu formă complexă.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Realizarea de teste de triere de înalt randament, într-un singur procedeu fiind evaluată acțiunea izolatului de testat față de agenți fitopatogeni majori, microorganisme antagoniste și plante gazdă;
- ✓ Asigurarea statistică a experimentelor datorită utilizării unor scheme de testare randomizată, ca de exemplu dreptunghiul latin, larg recunoscută în modelele de analiza varianței;
- ✓ Reducerea rezultatelor fals pozitive datorită monitorizării a doi parametri fiziologici corelabili care sunt determinați prin metode diferite;
- ✓ Posibilitatea evidențierii unor interacții între diferitele microorganisme ca urmare a expunerii reciproce și multiple la compușii difuzibili produși de celelalte tulpini din dispozitivul de testat;
- ✓ Testarea față de microorganisme dezvoltate pe medii cu selectivitate ridicată, care permit exprimarea tuturor caracteristicilor specifice, în structuri de tip biofilm, similare celor naturale, în care microorganismele prezintă rezistență la factorii de mediu, inclusiv antagonism;

In continuare invenția va fi descrisă în detaliu cu referire și la figurile 1... 4.



Haese

Fig. 1. Fabricarea senzorului electrochimic de oxigen prin printare pe suport flexibil.

Fig. 2. Amplasarea senzorilor specifici, electrochimic pentru oxigen și optochimic pentru bioxid de carbon, în godeul unei plăci de microtitrare, și conectarea acestor senzori la instrumentele pentru măsurare.

Fig. 3. Placă de microtitrare cu 24 godeuri, care are inclus în fiecare godeu un senzor electrochimic de oxigen și un senzor fluorescent de bioxid de carbon.

Fig. 4. Fabricarea unei variante integrate și miniaturizate în care senzorul electrochimic de oxigen și cel optochimic de bioxid de carbon sunt preparați prin tehnica strat peste strat, prin printări succesive cu cerneluri specifice.

Exemplul 1. Se pornește cu etapa de fabricare a senzorilor de oxigen electrochimici pe substrat flexibil. Se folosește o mașină de printat disponibilă comercial, ca de ex. ATMA ESC Germania. Toate cernelurile (grafit sau carbon, argint/clorura de argint, etc) sunt din categoria celor accesibile comercial, cum sunt de de ex. cele produse de către Ercon SUA. Gelul de electrolit se prepara de exemplu din KNO_3 pudra dizolvată în apă pură cu gelatina pudră 1:5. Membrana se prepara din Nafion 5% (masă /volum) soluție în amestec alcool - apă. Se folosesc soluții de Nafion 5% alcool - apă disponibile comercial, cum este cea produsă de Fuel Cell Earth, SUA, care conține Nafion, copolimer de poli(acid perfluorosulfonic) și politetrafluoroetilenă, 5%, metanol <5%, 1-Propanol 15-30%, 2-Propanol 15-30% și apă până la 100%. (Nafion este marcă înregistrată DuPont).

Cu referire și la figura 1, etapele de fabricare conform cu stadiul actual al tehnicii sunt următoarele:

1. Folosirea ca substrat **1** a materialelor plastice pe bază de polietilen tereftalat poliester (Mylar, HP Company) sau polioxifenilenpiromilitimida (Kapton, DuPont), tratate termic la 100°C pentru evitarea contractărilor ulterioare (shrinkage-ului);
2. Printarea stratului de bază de grafit (carbon) **2** pentru electrodul de lucru (working electrode, WE) și cel auxiliar **3** (Aux);
3. Printarea electrodului de referință **4** (Ref) cu cerneală de Ag / AgCl;
4. Printarea spotului de platină **5** de pe WE peste filmul uscat de grafit **2**;
5. Depunerea de gel electrolit **6** pe electrozi, cu uscare timp de 2 h la 25°C;
6. Depunere membrană Nafion **7** pe electrozi, cu uscare timp de 2 h la 25°C;
7. Printarea stratului izolator **8**, cu ferestre peste membrană și pentru a lăsa libere contactele electrozilor;
8. Aplicarea unor proceduri de uscare, la 80°C pentru 15 min, între pașii 2-3; 3-4; 4-5; și după pasul 5.



Haeseer

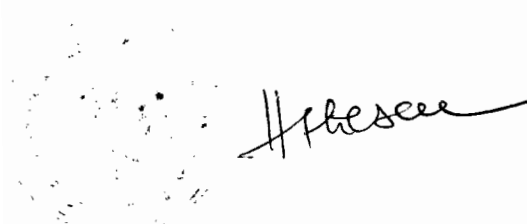
În final se obține un senzor electrochimic de oxygen 9 pe substrat flexibil ca cel din figura 1 care se poate aplica lateral pe pereții interiori ai fiecărui godeu.

Se continuă cu fabricarea senzorilor de Bioxid de carbon fluorescenți pe substrat plastic transparent. Pentru fabricarea acestor senzori se folosește un colorant fluorescent sensibil la CO₂, ca de exemplu colorantul 8-hidroxipiren-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) produs de Kodak. Cu referire la figura 2, filmul fluorescent **10** se prepara cu compoziția generală: {colorant indicator / agent de transfer de fază / polimer / plasticizant / suport}, adică în acest caz {HPTS / hidroxid de tetraoctilamoniu / etil celuloză / tributil fosfat / plastic (fundul plastic al cuvetei cilindrice-godeu, la interior)}. În prezența bioxidului de carbon acest fluorofor are un spectru de excitație cu un pic la 517 nm și un spectru de absorbție cu un maxim la 585 nm, amplitudinea semnalului fluorescent fiind proporțională cu concentrația de CO₂ din mediu. În continuare, membrana **11** în formă de rondel din policarbonat cu pori de 0,1 μm se aplică la baza fiecărui godeu, fixarea etanșă făcându-se prin sudură de radio-frecvență (RF) **12**. Citirea semnalului electrochimic se face cu un amperometru (galvanometru / potentiostat) **13**. Este de preferat folosirea unui aparat multicanal, cum este de exemplu galvanometru potentiostat multicanal VesaSTAT MC produs de Princeton Applied Research. Se poate folosi și o baterie de mini-bi-potențioastate / galvanometru, de tipul DRP-STA 200 produs de Dropsens (Spania). Orice alte instrumente cu caracteristici similare pot fi folosite pentru măsurarea intensității curenților generat de senzorii electrochimici prin descărea oxigenului pe catodul de oxigen din componența senzorului electrochimic pentru oxigen.

Lumina pentru senzorul optochimic este furnizată de o sursă pulsatorie **15**, citirea făcându-se cu o fibră optică bifurcată **14** la un spectrometru **16**. Se pot folosi dispozitivele furnizate de ex. de Avantes BV, respectiv sursa pulsatorie AvaLight XE Xenon, microfibră optică bifurcată Micro Transmission Dip Prob, spectrometrul multicanal Multi-channel AvaSpec-USB1 cu detector DDDD (128/256/1024/2048). Orice alte dispozitive comerciale cu caracteristici similare pot fi utilizate.

Amplasarea senzorilor electrochimici și optochimici se arată în figura 2 pe un singur godeu. Se aplică aceeași procedură pentru fiecare godeu al unei plăci cu 24 de godeuri, obținându-se dispozitivul din figura 3.

Se ambalează placa cu 24 godeuri, cu senzorii fixați în fiecare godeu, care au conexiuni pentru instrumentele cu care li se citește semnalul specific, în pungi termosudabile de polietilenă de înaltă densitate, și sterilizarea prin iradiere

A handwritten signature in black ink, possibly reading "H. H. H. H.", is written over a circular stamp. The stamp is mostly illegible but appears to contain some text and a central emblem.

gamma, la o doză de 25 kGy. Plăcile sterilizate se păstrează până la utilizare; durata de păstrare este de min. 12 luni.

Se realizează o schemă de testare, randomizată în dreptunghi latin, cu 6 variante în 4 repetiții, incluzând: 2 variante cu microorganisme fitopatogene specifice unei plante gazdă, 1 variantă cu microorganism antagonist larg răspândit, o variantă cu plantule gazdă, obținute în condiții gnotobiotice și 2 variante cu izolate de testat.

Variantele de testare sunt ilustrate în acest exemplu pentru tomate, plante de cultură la care mijloacele biologice de combatere pe bază de microorganisme antagoniste au o largă piață de desfacere.

V1 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

V2 - *Phytophthora infestans*

V3 - *Bacillus subtilis* B49b

V4 - plantule de tomate, *Lycopersicum esculentum*, crescute în condiții gnotobiotice;

V5, V6 - izolate de testat.

Aplicarea schemei de randomizare pentru placa de 24 godeuri, 6 variante în 4 repetiții, este prezentată în tab.1.

Tab.1. Schema de randomizare a celor 6 variante în 4 repetiții aplicată pentru placa cu 24 godeuri.

	1	2	3	4	5	6
A	V4	V5	V3	V6	V2	V1
B	V6	V2	V4	V5	V1	V3
C	V3	V1	V5	V2	V4	V6
D	V5	V3	V1	V4	V6	V2

Se prepară următoarele medii lichide specifice pentru diferitele microorganisme de testat: mediu cu suc vegetal V8 (suc vegetal V8, pe bază de bulion de roșii cu extract de legume - 210 ml; CaCO₃ - 3 g, apă până la 1000 ml) pentru *Phytophthora infestans*; mediu cu decoct de cartof (1000 ml din decoct obținut prin fierberea timp de 1 oră a 200 g cartofii tăiați cubuleț; 20 g glucoză) pentru *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, mediu nutrient lichid (bactopeptonă 5 g; extract de carne 3 g apă până la 1000 ml) pentru *Bacillus subtilis* B49b, mediu glucoză - extract drojdie (glucoză 20 g, extract drojdie 10 g, apă până la 1000 ml) pentru izolatele de testat din punct de vedere al antagonismului.

Aceste medii se hidrogelifiează prin depunerea unor pelete de Poloxamer 409 în proporție de 40% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte



H. Haese

la frigider pentru hidratare și omogenizarea mediilor lichide reci. Mediile se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, după care se răcesc pentru lichefiere până la 4°C. (Poloxamer 407 / Pluronic® F127, produs BASF AG, este un copolimer de polioxi-etilenă și polioxi-propilenă, care 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

Se prepară un mediu mineral nutritiv pentru plante cu formula: 0,4 g NH₄H₂PO₄; 2,4 g KNO₃; 1,6 g Ca(NO₃)₂; 0,8 g MgSO₄, la care se adaugă soluția de microelemente din tab.2. Mediu nutritiv mineral se hidrogelifică prin depunerea unor pelete de poloxamer 409 în proporție de 30% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare. Se omogenizează mediul lichid rece, se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min și se răcește mediul pentru lichefiere până la 4°C. Se depun aseptice câte 2,5 ml mediu hidrogelificat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu corespunzător repetițiilor pentru varianta plantulă mediu de cultură și se adaugă aseptice plantule de 5 zile din plante de tomate, provenite prin germinare din semințe dezinfectate și creștere într-un sistem gnotobiotic.

Tab. 2. Soluția de oligo și microelemente care se adaugă la mediul mineral nutritiv.

Sare minerală	Formula	grame / l	mg/l – ppm (în soluția finală)
Acid boric	H ₃ BO ₃	0,57	0,50 ppm B
Sulfat de mangan	MnSO ₄ • H ₂ O	0,31	0,50 Mn
Sulfat de zinc	ZnSO ₄ • 7(H ₂ O)	0,09	0,10 Zn
Sulfat de cupru	CuSO ₄ • 5(H ₂ O)	0,08	0,08 Cu
Molibdat de sodiu	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,098	0,04 Mo
Clorură de cobalt	CoCl ₂ • 6(H ₂ O)	0,0008	0,001 Co

Pentru producerea plantulelor gnotobiotice semințele de tomate dintr-un cultivar cunoscut se sterilizează chimic prin imersare repetată de trei ori în soluție de hipoclorit de sodiu 1%, intercalat cu clătiri cu apă distilată sterilă și apoi imersare de trei ori în soluții de alcool etilic 30%, intercalat cu clătiri cu apă distilată sterilă. Semințele se pun la germinat în pungi sterile cyg Mega (Mega Internațional), umectate cu soluție nutritivă sterilă. Alternativ se pot pune la germinat pe hârtie de filtru sterilă dispuse în plăci Petri sterile, din sticlă cu diametrul de 9 cm. Se incubă pungile (sau plăcile Petri) într-o cameră de creștere



plante, timp de 5 zile, la o temperatură de 25°C, cu o rată de iluminare de 120 $\mu\text{moli fotoni m}^2 \text{s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 12 ore pe zi.

Plantulele gnotobiotice se transferă aseptice în placa cu 24 godeuri conform schemei de randomizare din tab.1. Se incubează plăcile cu medii cu plantule gazdă într-o cameră de creștere plante, timp de 48 ore, termostată la o temperatură de 25°C, cu o rată de iluminare de 120 $\mu\text{moli fotoni m}^2 \text{s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 12 ore pe zi;

Se scot mediile pentru microorganisme din frigider și se inoculează aseptice 7,5 ml de mediu lichefiat la 4°C, cu 2,5 ml dintr-o suspensie având o densitate de 10^5 ufc/ml microorganisme de testat în mediu lichid specific corespunzător, depunerea aseptice a 2,4 ml mediu hidrogelifiat lichefiat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu al unei plăci cu 24 de godeuri, conform schemei de randomizare care include variantele cu microorganisme fitopatogene, antagoniste și tulpinile de testat (din tab.1).

Se incubează microplăcile cu medii inoculate cu microorganisme și cu plantule gazdă / celule vegetale într-o cameră de creștere plante, timp de 24 ore, la o temperatură de 25°C, cu o rată de iluminare de 120 $\mu\text{moli fotoni m}^2 \text{s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 12 ore pe zi.

După 24 ore se scot plăcile de la camera de creștere, se înlătură folia protectoare de pe fundul plăcii cu 24 de godeuri și se așează aseptice placa într-un recipient paralelipipedic steril, cu dimensiuni ale bazei apropiate de cele ale plăcii de microtitrare. Recipientul steril are marginile etanșizate cu șnur de cauciuc siliconic și este prevăzut cu umeri de fixare a bazei plăcii și cu două tuburi de acces. Pe unul din tuburile de acces se introduce un volum de 100 ml tampon fosfat salin steril în recipientul de bază. Se conectează sistemul de senzori, pentru oxigen și pentru bioxid de carbon, la aparatele de măsură specifice (potențiostat multicanal, spectrometru multicanal și sursă de lumină pulsatorie), și se așteaptă timp de 10 ...12 min stabilizarea semnalului senzorilor. Se monitorizează semnalul încă 120 min pentru a se observa eventuale modificări ale acestuia. Se înregistrează semnalele senzorilor de oxigen și bioxid de carbon.

Se prelucrează semnalele senzorilor de oxigen și bioxid de carbon se corelează acestea și apoi se analizează statistic rezultatelor prin teste de analiza varianței (de exemplu cu ajutorul soft-ului ARM 8, Gylling Data Management, SUA. Poate fi utilizat orice alt soft cu posibilități de analiza varianței în experimentele amplasate randomizat în matrice de dreptunghi latin.) Se evidențiază izolatele care au determinat reducerea la 50% a respirației unor tulpini de antagoniști, fără a reduce respirația celulelor plantei gazdă și/sau a



Haesece

microorganismelor antagoniste. Aceste izolate se rețin pentru studiile ulterioare de identificare taxonomică și de caracterizare a eficacității *in vitro* și a inocuității față de eucariote.

Exemplul 2. Se procedează la fel ca la exemplul 1, numai că se folosesc următoarele variante:

V1 - *Fusarium graminearum*

V2 - *Pyrenophora tritici-repentis*

V3 - *Trichoderma viride* Td50

V4 - plantule de grâu, *Triticum aestivum*, crescute în condiții gnotobiotice

V5, V6 - tulpini de testat.

Se folosesc următoarele medii de cultură pentru microorganismele testate. mediu cu decoct de cartof (1000 ml din decoct obținut prin fierberea timp de 1 oră a 200 g cartofii tăiați cubuleți; 20 g glucoză) pentru *Fusarium graminearum*, mediu cu suc vegetal V8 (suc vegetal V8, pe bază de bulion de roșii cu extract de legume - 210 ml; CaCO₃ - 3 g, apă până la 1000 ml) pentru *Pyrenophora tritici-repentis*, mediu cu următoarea compoziție: 2 g of KH₂PO₄; 1,4 g of (NH₄)₂SO₄; 0,3 g of CaCl₂·2H₂O; 0,3 g of MgSO₄·7H₂O; 0,6 g uree; 10 mg of FeSO₄·7H₂O; 2,8 mg ZnSO₄·2H₂O, 10 g glucoză, apă până la 1000 ml); pentru *Trichoderma viride* Td50, mediu glucoză - extract drojdie (glucoză 20 g, extract drojdie 10 g, apă până la 1000 ml) pentru izolatele de testat din punct de vedere al antagonismului. Plantulele de grâu se cresc pe același mediu care au fost crescute plantulele plantei gazdă în exemplul 1.

Exemplul 3. Se procedează la fel ca la exemplul 1, numai că se folosesc următoarele variante:

V1 - *Fusarium verticilloides*

V2 - *Aspergillus flavus*

V3 - *Saccharomyces cerevisiae* L30b

V4 - plantule de porumb, *Zea mays*, crescute în condiții gnotobiotice

V5, V6 - tulpini de testat.

Se folosesc următoarele medii de cultură pentru microorganismele testate. mediu cu decoct de cartof (1000 ml din decoct obținut prin fierberea timp de 1 oră a 200 g cartofii tăiați cubuleți; 20 g glucoză) pentru *Fusarium verticilloides*, mediu YS (extract de drojdie 20 g, zaharoză 60 g, apă până la 1000 ml, pH 5,8) pentru *Aspergillus flavus*, mediu YPD (extract drojdie 10 g, peptonă 20 g, glucoză 20 g, apă până la 1000 ml) pentru *Saccharomyces cerevisiae* L30b, mediu glucoză - extract drojdie (glucoză 20 g, extract drojdie 10 g, apă până la 1000 ml) pentru izolatele de testat din punct de vedere al antagonismului. Plantulele de porumb



H. Haeser

se cresc pe același mediu care au fost crescute plantulele plantei gazdă în exemplul 1.

Exemplul 4. Se procedează la fel ca în exemplul 2, folosindu-se numai izolate de *Trichoderma*. La sfârșitul celor 120 min se testează inducerea activității chitinolitice în tulpinile testate, comparativ cu tulpina etalon *T. viride* Td50. Se folosește ca substrat 4-metilumbelliferil-*N*-acetil--glucosaminide (4-MeUNAG) (Sigma, St. Louis), în concentrație de 5,5 nmol per fiecare godeu cu *Trichoderma*, 10,5 mg de 4-MeUNAG se dizolvă într-un erlenmayer de 100 ml termorezistent în cca 20 ml de apă distilată la 100°C, se răcește rapid la temperatura camerei, se trece cantitativ în cotel de 25 ml, se aduce la semn. Din această soluție de substrat se iau 25μl, care se adaugă peste godeurile în care au existat antagoniști. Se determină fluorescența, cu excitație la 355 nm și citire la 460nm, care este direct proporțională cu activitatea chitinazică.

Exemplul 5. În acest caz se realizează o variantă integrată și miniaturizată de senzori, care se dăpsun în plăcu cu 96 godeuri. Cu referire la figura 4, în acest caz, este vorba de fabricarea unei variante *integrata si miniaturizata*, în care (i) senzorul electrochimic, (ii) cel(e) optochimic(e) sub forma de spoturi de coloranți fluorescenți (dyes), împreună cu (iii) membrana micro- poroasă, sunt preparate prin tehnica strat-peste-strat, prin printari succesive pe substratul complex și flexibil. Operațiile individuale-separate nu sunt diferite de cele descrise la Exemplul 1. Prin contrast însă, printarea lor se realizează cu precizie, la scara micro și astfel se produce integrat și miniaturizat. Procesul este complex dar compus din pași simplii, și se pretează la automatizare.

Dupa printare și uscare, obținem structuri complexe integrat miniaturizate și flexibile. O astfel de structură flexibilă cu forma complexă se atasază (i) la peretele interior vertical, (ii) la partea conică a fiecărui godeu și respectiv (iii) fixată orizontal la interiorul aceluși godeu. Varianta integrată și miniaturizată se poate fixa într-un godeu cu un volum de cel puțin 10 ori mai mic, iar întreg procesul de fabricare se poate automatiza.

Citirea semnalului electrochimic și pentru senzorul optochimic se face la fel ca la exemplul 1. Semnalele se multiplexează și se transferă pe computer prin intermediul unei interfețe standard. Un program special prelucrează apoi datele obținute.

Variantele de lucru în acest caz sunt:

V1 - *Pythium* spp.

V2 - *Rhizoctonia solanii*

V3 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

V4 - *Phytophthora infestans*



Handwritten signature

- V5 - *Alternaria solani*
- V6 - *Septoria lycopersici*
- V7 - tulpina de testat
- V8 - tulpina de testat
- V9 - *Bacillus subtilis* B49b
- V10 - *Trichoderma viride* Td50
- V11 - cultură de meristeme de tomate
- V12 - cultură de meristeme de căpșun

Aplicarea schemei de randomizare pentru placa de 96 godeuri, 12 variante în 8 repetiții, este prezentată în tab.1.

Tab.1. Schema de randomizare a celor 12 variante 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

Mediile de cultură sunt identice cu cele folosite în celelalte exemple, cu excepția variantelor cu culturi de meristeme, unde se folosește mediu Murashige-Skoog, MS, hidrogelificat prin depunerea unor pelete de poloxamer 409 în proporție de 30% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare. Mediul MS se omogenizează cu la rece, se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, se răcește pentru lichefiere până la 4°C, și se depune aseptice 0,3 ml de mediu steril hidrogelificat Murashige-Skoog și 0,1 ml de suspensie de cultură meristematică conținând 10^2 celule vegetale din plantele gazdă. Restul procedurii de lucru este la fel ca în exemplul 1.

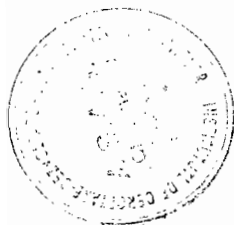


H. H. H. H. H.

**PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU TRIEREA IZOLATELOR DE
MICROORGANISME ANTAGONISTE FITOPATOGENILOR ȘI DISPOZITIV
PENTRU REALIZAREA ACESTUIA**

Revendicări

1. Procedeu de înalt randament pentru trierea izolatelor de microorganisme antagoniste fitopatogenilor caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: fabricarea de senzori de oxigen electrochimici pe substrat flexibil și de senzori optochimici fluorescenți pentru bioxid de carbon, fixarea câte unui senzor de oxigen și a unui senzor de bioxid de carbon fluorescent pe substrat de plastic transparent, în fiecare godeu dintr-o placă de microtitrare cu 24 godeuri, în care baza fiecărui godeu este reprezentată de o membrană de policarbonat, permeabilă particulelor > 0,1 μm , > 500 kD și realizarea de conexiuni la instrumentele de măsură a semnalele produse de senzori în funcție de concentrația de oxigen, respectiv bioxid de carbon, din godeul monitorizat; alternativ, pentru o placa de titrare cu 96 godeuri, fabricarea unei variante *integrate și miniaturizate*, în care senzorul electrochimic de oxigen, cel(e) optochimic(e) pentru bioxid de carbon, sub formă de spoturi de coloranți fluorescenți, împreună cu membrana micro-poroasă care reprezintă baza godeului, sunt preparate prin tehnica strat-pestestrat, prin printari succesive pe o membrană semipermeabilă > 0,1 μm , > 500 kD, iar structura flexibilă cu forma complexă se atasază la peretele interior vertical, la partea conică a fiecărui godeu, și respectiv fixată orizontal la interiorul aceluși godeu; ambalarea în pungi termosudabile de polietilenă de înaltă densitate, și sterilizarea prin iradiere gamma, la o doză de 25 kGy, a plăcilor cu 24...96 godeuri, cu senzorii fixați în fiecare godeu; realizarea unei scheme de testare, randomizată în dreptunghi latin, cu 6 variante în 4 repetiții pentru placa de 24 godeuri, incluzând: 2 variante cu microorganisme fitopatogene specifice unei plante gazdă, 1 variantă cu microorganism antagonist larg răspândit, 1 variantă cu plantele gazdă, obținute în condiții gnotobiotice și 2 variante tulpini de testat, și aplicarea acestei scheme de randomizare pentru placa de 24 godeuri; realizarea unei scheme de testare, randomizată în dreptunghi latin, cu 12 variante în 8 repetiții pentru placa de 96 godeuri, incluzând: 3 variante cu microorganisme fitopatogene specifice unei plante gazdă, 2 variante cu microorganisme antagoniste larg răspândit, 1 variantă cu celule de plante gazdă, obținute în condiții axenice, 6 variante cu tulpini de testat și aplicarea acestei scheme de randomizare pentru placa de 96 godeuri; prepararea de medii lichide specifice pentru diferitele microorganisme de testat,



H. H. H. H.

hidrogelifierea lor prin depunerea unor pelete de Poloxamer 409 în proporție de 40% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare, omogenizarea mediilor lichide reci, sterilizarea mediilor prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, răcirea mediilor pentru lichefiere până la 4°C; prepararea unui mediu nutritiv mineral pentru plante, hidrogelifierea lui prin depunerea unor pelete de poloxamer 409 în proporție de 30% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare, omogenizarea mediului lichid rece, sterilizarea mediului prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, răcirea mediului pentru lichefiere până la 4°C, depunerea aseptică a 2,5 ml mediu nutritiv mineral hidrogelifiat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu al unei plăci corespunzătoare repetițiilor pentru varianta plantulă mediu de cultură și adăugarea aseptică a unor plantule de 5 zile din planta gazdă, provenite prin germinare din semințe dezinfectate și creștere într-un sistem gnotobiotic; alternativ pentru placa cu 96 godeuri prepararea unui mediu Murashige-Skoog, hidrogelifierea lui prin depunerea unor pelete de poloxamer 409 în proporție de 30% față volumul de mediu de cultură și lăsarea peste noapte la frigider pentru hidratare, omogenizarea mediului lichid rece, sterilizarea mediului prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, răcirea mediului pentru lichefiere până la 4°C, depunerea aseptică a 0,3 ml de mediu steril hidrogelifiat Murashige-Skoog și adăugarea aseptică a 0,1 ml de suspensie de cultură meristematică conținând 10^2 celule vegetale din plantele gazdă; incubarea plăcilor cu medii cu plantule gazdă / celule vegetale într-o cameră de creștere plante, timp de 48 ore, termostată la o temperatură de 25°C, cu o rată de iluminare de $120 \mu\text{moli fotoni m}^2 \text{ s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 12 ore pe zi; inocularea aseptică a 7,5 ml de mediu specific fiecărui microorganism hidrogelifiat la 4°C, cu 2,5 ml dintr-o suspensie având o densitate de 10^5 ufc/ml microorganisme de testat în mediu lichid specific corespunzător, depunerea aseptică a 2,4 ml mediu hidrogelifiat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu al unei plăci cu 24 de godeuri, conform schemei de randomizare care include variantele cu microorganisme fitopatogene, antagoniste și tulpinile de testat; alternativ pentru placa cu 96 godeuri inocularea aseptică a 2,1 ml de mediu hidrogelifiat la 4°C, cu 0,7 ml dintr-o suspensie având o densitate de 10^5 ufc/ml microorganisme de testat în mediu lichid specific corespunzător, depunerea aseptică a 0,3 ml mediu hidrogelifiat, aflat la temperatura mai mică de 15°C, în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri, conform schemei de randomizare care include variantele cu microorganisme fitopatogene, antagoniste și tulpinile de testat; Incubarea plăcilor cu plantule gazdă / celule vegetale, microorganisme fitopatogene, antagoniste și tulpinile de testat, timp de 24 ore, la



H. Heseu

o temperatură de 25°C, cu o rată de iluminare de 120 $\mu\text{moli fotoni m}^2 \text{ s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 12 ore pe zi; înlăturarea foliei protectoare de pe fundul plăcii cu 24 sau 96 de godeuri și așezarea aseptică a plăcii într-un recipient paralelipipedic steril, cu dimensiuni ale bazei apropiate de cele ale plăcii de microtitrare, cu margini etanșeizate cu șnur de cauciuc siliconic și prevăzut cu umeri de fixare a bazei plăcii; introducerea de tampon fosfat salin steril în recipientul de bază, termostatarea întregului sistem prin introducerea într-un vas termostatat cu apă la 25°C, conectarea sistemului de senzori de monitorizare oxigen la un aparat de măsură specific, potențostat multicanal, stabilizarea semnalului senzorilor și monitorizarea acestuia; monitorizarea producerii de bioxid de carbon prin determinarea fluorescenței fluorosenzorilor specifici; prelucrarea semnalelor senzorilor de oxigen și bioxid de carbon, corelarea acestora, analiza statistică a rezultatelor și evidențierea izolatelor care au determinat reducerea la 50% a respirației unor tulpini de fitopatogeni, fără a reduce respirația celulelor plantei gazdă și/sau a microorganismelor antagoniste; realizarea de determinări ulterioare pentru evidențierea unor compuși implicați în micoparazitism, cum sunt chitinazele / N-acetilglucosaminidazele; realizarea de determinări ale cantității de biofilm format, care este în directă corelație cu semnalele implicate în comunicarea dintre microorganisme și/sau microorganisme și plante, și cu compușii care interferă cu aceștia, printr-o mică modificare a procedurii, respectiv înlăturarea foliei protectoare de pe fundul plăcii cu 24 de godeuri înainte de incubarea separată timp de 24 de ore a tulpinilor de microorganisme, și expunerea la compușii difuzibili care interferă comunicarea de grup / quorum sensing la microorganisme; folosirea unor medii de cultură minimale pentru microorganisme, mimetice pentru o serie de microbiocenoze naturale, pentru a selecta izolatele care prezintă competiția pentru nutrienți.

2. Dispozitiv pentru aplicarea invenției, care include o variantă integrată și miniaturizată, în care senzorul electrochimic de oxigen și cel(e) optochimic(e) pentru bioxid de carbon, sub forma de spoturi de coloranți fluorescenți, sunt preparate prin tehnica strat - peste - strat, prin printări succesive pe un substrat flexibil și transparent reprezentant de membrana semipermeabilă 0,1 μm , structura flexibilă cu forma complexă rezultată se atașează la pereții interior vertical, la partea conică a fiecărui godeu, și respectiv fixată orizontal la interiorul fiecărui godeu dintr-o placă de microtitrare cu 96 godeuri, iar marginea a de jos a pereților godeurilor este sudată de partea fixată orizontal a structurii flexibile cu formă complexă.



H. Halseer

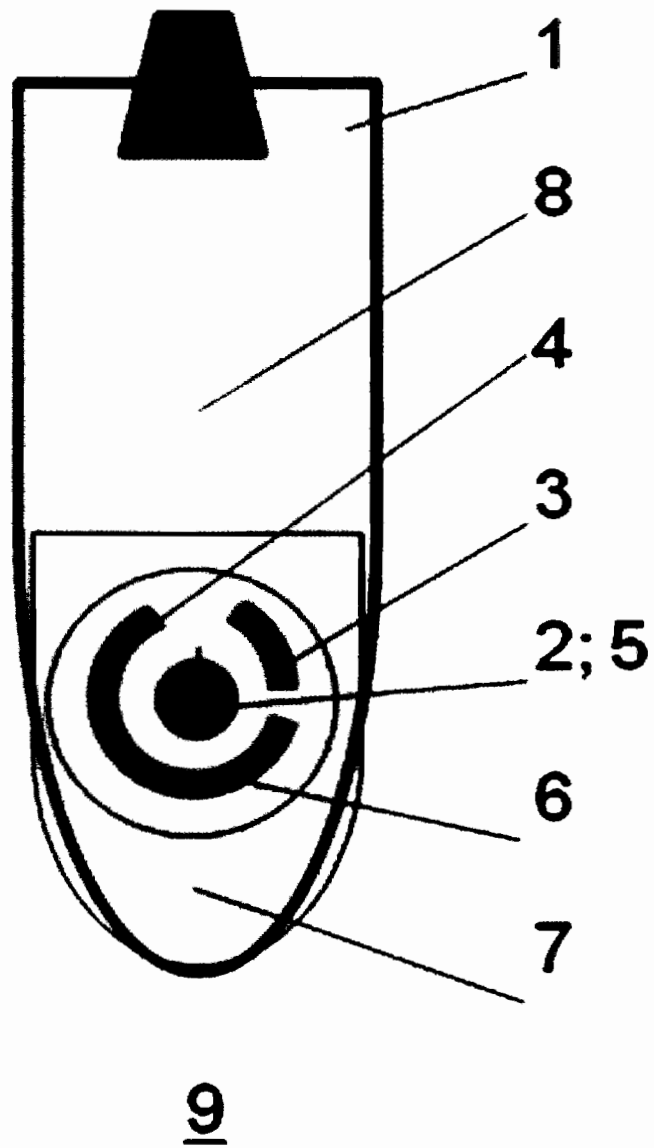
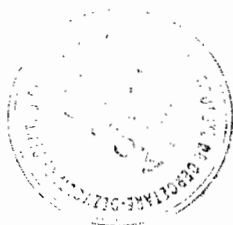


FIGURA 1



Haese

y

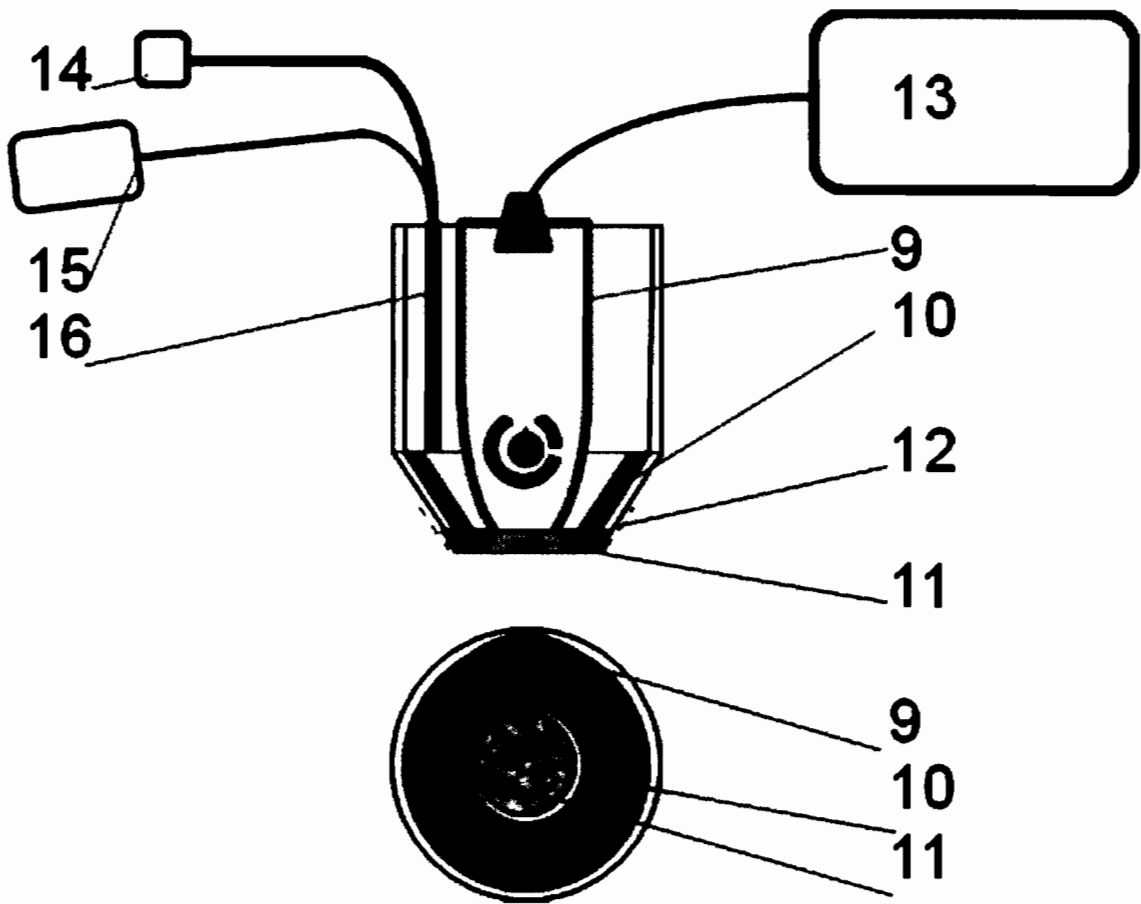
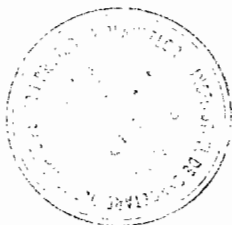


FIGURA 2



H. Hesse

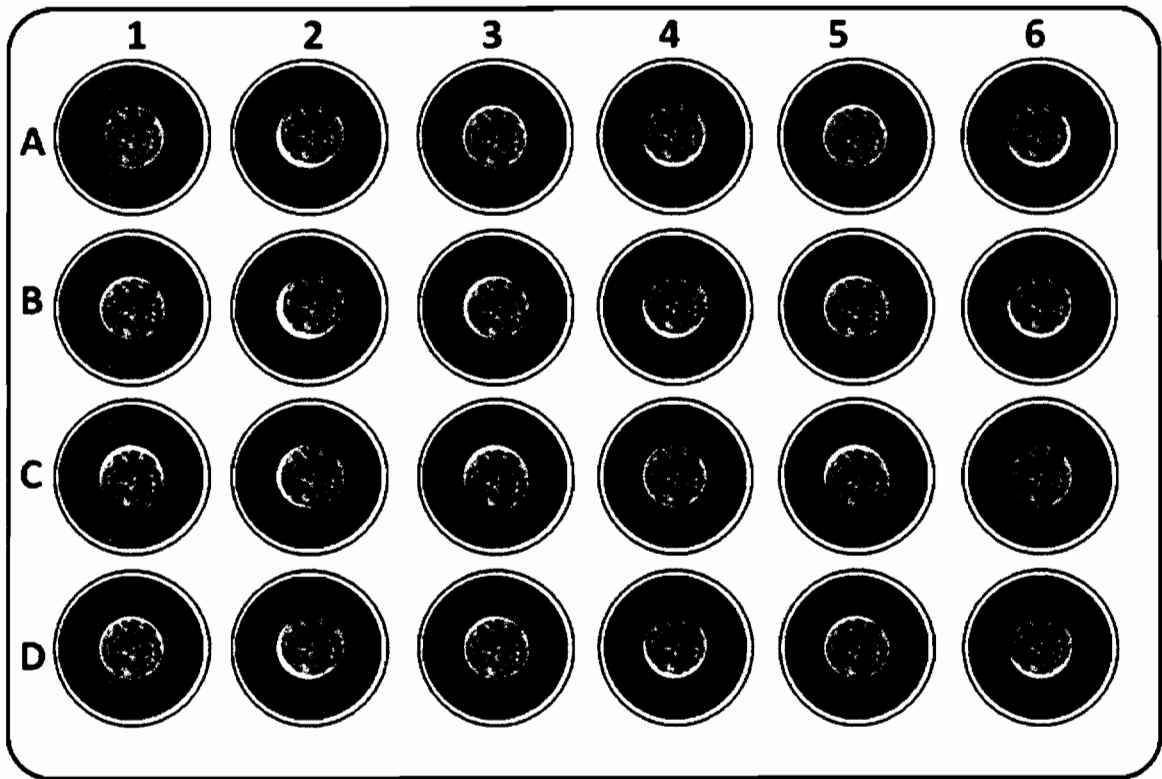
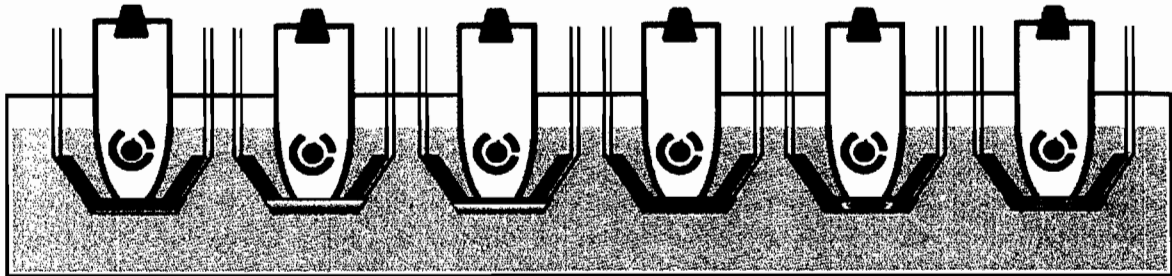


FIGURA 3



H. Heseu

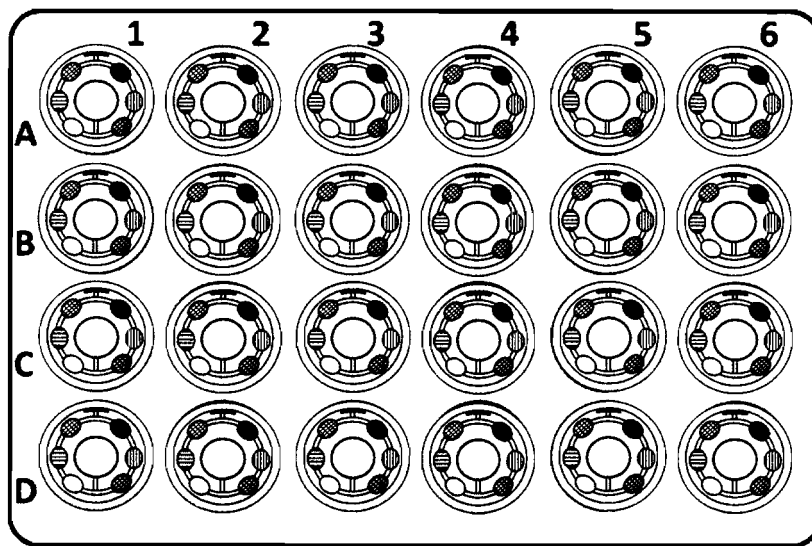
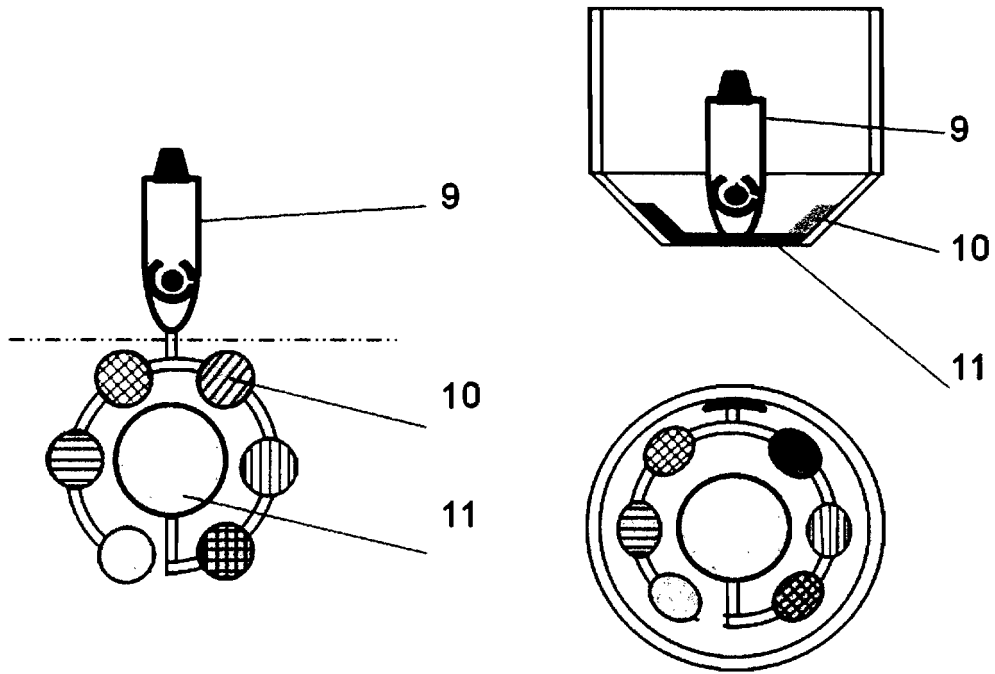


FIGURA 4



Halsen