



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00937**

(22) Data de depozit: **02/12/2014**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2016 BOPI nr. **6/2016**

(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;**

• **ABRAHAM BEATA,
STR. MIHAI EMINESCU NR. 1, SC.A, AP.22,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SZABOLCS LANYI ȘTEFAN, STR.MIKO
NR.21, MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU SELECȚIA
CONSORȚIILOR DE MICROORGANISM CU ACȚIUNE DE
STIMULARE A PLANTELOR CULTIVATE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru selecția unor consorții de microorganisme cu acțiune de stimulare a plantelor cultivate. Procedeu conform invenției constă în depunerea aseptică, pe o placă de microtitrare cu un singur godeu, a unui strat detector cu o grosime de 2 mm, adăugarea aseptică a unui mediu de cultură hidrogelificat, în care se omogenizează substanțe cu rol de exosemnale, inocularea mediului cu 12 tulpini de microorganisme de testat, distribuite randomizat în 8

repetiții, incubarea timp de 24...60 h a plăcii de microtitrare la temperaturi de 24...28°C, cu preluarea imaginilor din 12 în 12 h, realizarea în paralel a unei plăci martor, și analiza imaginilor preluate pentru cele două plăci, pentru identificarea consorțiilor microbiene de consens.

Revendicări: 6
Figuri: 1



PROCEDEU DE ÎNALT RANDAMENT PENTRU SELECȚIA CONSORȚIILOR DE MICROORGANISM CU ACȚIUNE DE STIMULARE A PLANTELOR CULTIVATE

Prezenta invenție se referă la un procedeu de înalt randament pentru selecția rapidă a consorțiilor de microorganisme care au o acțiune de biostimulare a plantelor cultivate, datorită producerii de compuși care biodisponibilizează nutrienți, au acțiune de fitohormoni sau de modulatori ai căilor metabolice implicate în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici.

Sunt cunoscute o serie de procedee prin care sunt selectate tulpini de microorganisme care au efecte benefice, de biostimulare a plantelor cultivate. Astfel de tulpini de microorganisme reprezintă ingredientul activ pentru o categorie emergentă de (bio)produse, utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, biostimulanții pentru plante (a se vedea de ex. recentul review Calvo *et al.* 2014, *Plant Soil*, 383, 3-41). Biostimulanții pentru plante modulează procesele naturale „pentru a spori absorbția și eficiența utilizării nutrienților, toleranța la stresurile abiotice și calitatea recoltei” (www.biostimulants.eu). Biostimulanții pentru plante nu interacționează semnificativ în mod direct cu agenții de dăunare ai culturilor agricole, dar cresc toleranța plantelor la stresurile biotice induse de acești agenți, prin modularea răspunsului de apărare din plante. Microorganismele biostimulante pentru plante reprezintă una din modalitățile de intensificare durabilă a producției agricole în această perioadă de schimbări climatice (Sofa *et al.* 2014, în *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes*, Ahmad *et al.* eds, Springer, New York, pp 107-117). Biostimulanți pentru plante microbieni se utilizează în special ca inoculanți ai seminței / rizosferei, deci microorganismele selectate pentru astfel de bioproduse de uz agricol sunt microorganisme provenite de obicei din sol.

Cererea de brevet WIPO 2014 046553 A1 se referă la un procedeu pentru selecția, identificarea și/sau aplicarea unor microorganism care au capacitatea de a induce apariția unor caracteristici benefice în plantele de cultură. Procedeu implică cel puțin următoarele etape: (a) expunerea uneia sau mai multor plante (inclusiv semințe, plantule, butași și/sau propagule astfel rezultate) la un mediu de cultură care include un prim set format din unul sau mai multe microorganisme; (b) selectarea uneia sau a mai multor plante după etapa (a); (c) obținerea unui al doilea set format din unul sau mai multe microorganisme, din una sau mai multe

plante selectate în etapa (b); (d) repetarea etapelor (a) până la (c) de una sau mai multe ori, în care cel de-al doilea set format din unul sau mai multe microorganisme obținute în etapa (c) este folosit ca un prim set în etapa (a), pentru orice altă repetiție ulterioară.

Prin acest procedeu se pot selecta consoții de microorganisme benefice pentru plantele de cultură testate, dar timpul necesar pentru realizarea tuturor etapelor este îndelungat, iar consumul de materiale și forță de muncă este semnificativ.

Cererea de brevet RO127470 A2 descrie un procedeu care asigură detectarea prezenței unor tulpini care stimulează dezvoltarea plantelor de cultură; procedeul implică monitorizarea a doi parametri fiziologici, corelabili, determinați prin metode diferite, ale culturilor de microorganisme și de țesuturi vegetale pe medii gelificate, expuse reciproc la compușii care difuzează într-un mediu lichid. În acest procedeu se utilizează plăci de microtitrare, cu 24 și 96 godeuri, în care baza fiecărui godeu este reprezentată de o membrană de policarbonat, permeabilă particulelor $> 0,1 \mu\text{m}$, $> 500 \text{kDa}$. Plăcile cu mediu gelificat, în care sunt cultivate microorganismele și culturi de țesuturi vegetale, se așează aseptice într-un recipient paralelipipedic steril, cu dimensiuni ale bazei apropiate de cele ale plăcii de microtitrare, prevăzută cu umeri de fixare a bazei plăcii, la care marginile sunt etanșeizate cu șnur de cauciuc siliconic, și în care este introdus tampon fosfat steril, în cantitate suficientă pentru a atinge membrana semi-permeabilă de policarbonat. În tamponul fosfat salin de la baza godeurilor difuzează compușii pe care-i produc diferitele tulpini testate și/sau culturile de țesuturi vegetale, expunerea fiind reciprocă, între toate tulpinile și culturile de țesuturi vegetale testate. Datorită acestei expuneri reciproce extinse procedeul permite numai detectarea prezenței unei tulpini cu activitate de biostimulare a țesuturilor vegetale, fără a asigura identificarea certă a acesteia. Stabilirea exactă tulpinilor care se stimulează reciproc în producerea de compuși benefici pentru plantele de cultură implică efectuarea a unor experimente în paralel, în care sunt schimbate pe rând câte una din tulpinile testate. Datorită acestui dezavantaj al procedurii randamentul de tulpini / consoții selectate per unitate de timp și per cantitate de reactivi este limitat.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de selecție rapidă a tulpinilor care pot forma consoții microbiene de consens,

producătoare de compuși cu rol de biostimulare a plantelor cultivate, și care răspund specific, prin producerea suplimentară de compuși biostimulanți, la exo-semnalele prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste, destinate contracarării stresurilor biotice și abiotice.

Noțiunea de „consorții microbiene de consens” se referă la comunitățile de microorganisme provenite din sol, procariote (bacterii, gram-negative sau gram- pozitive, cianobacterii) și/sau arhee (de ex. microorganisme extremofile) și/sau eucariote (drojdii / levuri, fungi, alge), în care interacțiunile biologice sunt reciproc benefice și care se potențează reciproc în biosinteza și secreția de compuși biostimulanți pentru plante.

„Compuși cu rol de biostimulare a plantelor cultivate” considerați în această invenție sunt compuși care cresc biodisponibilitatea unor nutrienți pentru plante (siderofori, compuși organici care solubilizează fosforul), fitohormoni (auxine, gibereline, citochinine, acid abscisic) sau modulatori ai căilor metabolice implicate în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici (poliamine, oligozaharine, siliciu solubil).

„Exo-semnalele prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste” se referă la strigolactone, benzoxazinoide, amestecuri de compuși fenolici și aminoacizi non-proteici, compuși care sunt secretați de rizosfera plantelor pentru a recruta microorganisme benefice.

Procedeeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu a unui strat detector, cu o grosime de 2 mm, cu răspuns specific, evidențiable printr-o reacție de culoare, la compuși cu rol de biostimulare a plantelor cultivate;
- ✓ Adăugarea aseptică peste stratul detector a unui mediu de cultură sterilizat, cu o grosime de 6-7 mm, care este hidrogelificat cu un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol și în care se omogenizează soluții sterilizate prin ultrafiltrare, din substanțele care au rol de exo-semnale, prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste sau respectiv de analogi biomimetici ai acestor exo-semnale;
- ✓ Inocularea în condiții axenice a stratului superior de mediu de cultură hidrogelificat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții, prin preluarea, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini din oțel inox, a 10-20 μl de inocul

lichid, cu 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;

✓ Incubarea timp de 24 - 60 ore a plăcii de microtitrare, la temperaturi de 24-28°C, cu preluarea imaginilor: stratului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare, din 12 în 12 ore;

✓ Realizarea în paralel a 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, cu ajutorul unui replicator cu 96 pini, pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri, în care partea inferioară este o membrană de ultrafiltrare, așezată peste stratul detector, cu răspuns specific, evidențiable printr-o reacție de culoare, la compuși cu rol de biostimulare a plantelor cultivate, și care conține în fiecare godeu aceeași grosime de mediul de cultură incluzând substanțe cu rol de endo-semnale, sau analogi biomimetici ai acestor semnale, hidrogelificat cu un tribloc co-polimer;

✓ Incubarea timp de 24 - 60 ore a plăcii de microtitrare martor, la temperaturi de 24 - 28°C, cu preluarea imaginilor: stratului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare, din 12 în 12 ore;

✓ Analiza imaginilor preluate de sistemul de prelevare a imaginii 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 producerea compușilor de interes, evidențiați specific de stratul detector.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

✓ Stratul detector este fie un mediu agarizat, care include: indicatori de complexare a fierului pentru determinarea producerii de siderofori, cum este de exemplu mediul cu Chrome azurol S (CAS) și bromură de hexadeciltrimetilamoniu (HDTMA); sau săruri de fosfat anorganic insolubil, ca de exemplu hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; sau săruri de siliciu insolubil, cu este de exemplu silicatul de magneziu sintetic $\text{MgO}:\text{xSiO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$; fie un film care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic detector.

- ✓ Filmul care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic detector se obține prin preluarea cu un film adeziv, de pe o suprafață de sticlă, a unei matrici de sfere coloidale impregnate molecular, formată pe respectiva suprafață prin cristalizarea unei suspensii din respectivele sfere coloidale impregnate molecular, preparate prin polimerizare în emulsie fără agent emulsifiant;
- ✓ Moleculele folosite pentru impregnarea moleculară a sferelor coloidale sunt: acid indolic-3-acetic, acid giberelic, zeatină, acid abscisic, atunci când se urmărește detectarea consoțiilor de microorganisme care produc fitohormoni; putresceina sau oligalacturonide cu 10 resturi de galacturonosil legate α -1,4, pentru identificarea consoțiilor de microorganisme modulatori ai căilor metabolice implicate în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici;
- ✓ Soluțiile, sterilizate prin filtrare, de substanțe cu rol de exo-semnale prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste, sau de analogi biomimetici ai acestor semnale, se omogenizează în mediul hidrogelificat după lichefierea acestor medii prin răcire la 4-6°C;
- ✓ În mediul hidrogelificat și lichefiat se omogenizează următoarele soluții de substanțe, cu rol de exo-semnale / analogi biomimetici ai acestora, în următoarele concentrații finale în mediul lichefiat prin răcire: GR24, (3aR*,8bS*,E)-3-(((R*)-4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-iloxi)metilen)-3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-in-deno [1,2-b]furan-2-onă, analog de strigolactone, în concentrații de 5 până la $15 \cdot 10^{-6}$ M; DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-onă, în concentrații de 2 până la $5 \cdot 10^{-6}$ M; amestec echimolar de acid salicilic, acid 2-hidroxibenzoic, și GABA, acid gama-aminobutiric, fiecare în concentrații de 1 până la $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Realizarea concomitentă a screening-ului pentru mai multe caracteristici ale unor izolate / tulpini, respectiv producerea diferiților compuși cu acțiune biostimulantă asupra plantelor, interacția biologică cu alte 7 tulpini / izolate - antagonism, neutralism, mutualism, potențare reciprocă în producerea de compuși biostimulanți;

- Asigurarea statistică a experimentelor datorită utilizării unor scheme de testare randomizată, compatibile cu modelele de analiza varianței;

- Protejarea substanțelor care au rol de exo-semnale, prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste, respectiv analogii biomimetici ai

acestor semnale, de degradare termică, datorită omogenizării în mediile hidrogelifiate lichefiate prin răcire la 4 - 6°C.

- Posibilitatea evidențierii interacțiilor dintre microorganisme care se dezvoltă în structuri de tip biofilm, similare celor naturale, cu o rezistență sporită la factorii de mediu, inclusiv antagonism, datorită mediului hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer care stimulează formarea de biofilme.

În continuare invenția va fi descrisă în detaliu cu referire și la figura 1, care prezintă schema procedurii de selecție descris.

Fig. 1. Schema procedurii de înalt randament pentru selecția consorțiilor de microorganism cu acțiune de stimulare a plantelor cultivate.

Exemplu 1. Se realizează un mediu agarizat cu indicatori de complexare a fierului care va fi folosit ca strat detector pentru determinarea producerii de siderofori. Se prepară trei soluții: Soluția 1, de 0,06 g Chrome azurol S (CAS) în 50 ml de apă dublu distilată în instalație de cuarț; Soluția 2, 0,027 g of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ în 100 ml de HCl 10 mM HCl; Soluția 3, 0,073 g bromură de hexadeciltrimetilamoniu (HDTMA) în 40 ml de apă dublu distilată. Se amestecă soluția 1 cu 10 ml de soluție 2 și apoi se adaugă soluția 3. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 min și apoi se răcește. Se obține o soluție de complecși de fier de culoare albastră.

Se dizolvă 32,24 g acid N-2-etansulfonic-N-2-hidroxietil-piperazina (PIPES) în 850 ml apă dublu distilată a cărei pH a fost adus la o valoare mai mare de 6. Se amestecă și se aduce pH-ul la valoarea 6,8 prin adăugare de soluție NaOH 0,1 M. Se adaugă 15 g bacto agar. Se autoclavează și se răcește la 50°C. Se adaugă aseptice și cu încetul cei 100 ml de soluție de complecși de fier, aduși la aceeași temperatură, prin scurgere pe peretele vasului de sticlă și sub agitare. Se preiau aseptice 15,8 ml din mediul agarizat preparat ca mai sus, menținut în stare lichefiată prin termostatare la 50°C, care se distribuie în condiții axenice pe o placă de microtitrare cu un singur godeu (CELLSTAR® OneWell Plate™, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) pentru a forma un strat detector de 2 mm grosime.

Se prepară un decoct de cartofi prin fierberea a 200 grame de cartofi, spălați bine de resturile de pământ, dar necoșiți, și tăiați în cuburi cu latura de aprox. 1 cm, în aprox. un litru de apă distilată, pentru 30 minute. Se filtrează decoctul prin pânză de tifon dublă și se adaugă 20 grame de glucoză (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA). Se aduce la 1000 ml cu apă distilată. 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 decoct de cartof-dextroză și se lasă peste noapte la frigider pentru hidratare și omogenizare. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, după care se răcește pentru lichefiere până la 4°C. 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 99,5 ml de mediul steril de decoct de cartof – dextroză, hidrogelifiat cu Poloxamer 407, și lichefiat prin răcire la 6°C, se adaugă aseptice 0,5 ml soluție acetonică, sterilizată prin filtrare, care conține $5 \cdot 10^{-5}$ moli de GR24 – (3aR*,8bS*,E)-3-(((R*)-4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-iloxi)metilen)-3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno [1,2-b]furan-2-onă (Chiralix, Nijmegen, Olanda). Concentrația finală de GR24 în mediul hidrogelifiat este $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Se adaugă aseptice peste stratul detector pentru determinarea producerii de siderofori 47,4 ml de mediul decoct de cartof – glucoză – poloxamer, incluzând substanțele care au rol de exo-semnale, pentru a forma un strat cu grosime de 6 mm.

Acest strat superior de mediu de cultură hidrogelifiat cu poloxamer se inoculează cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții. Inocularea se realizează cu mici cantități de inocul lichid, prelevat cu ajutorul unui replicator de inox cu 96 pini (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 μl în fiecare godeu. Culturi re-împrospătate din tulpinile de testat, realizate pe mediu lichid decoct de cartof – glucoză, timp de 24 ore în cazul procariotelor (bacterii, gram-negative sau gram-pozitive, cianobacterii) și de 24 ore în cazul altor microorganisme, se normalizează prin diluție la 10^7 ufc/ml. Din aceste culturi se preiau 25 μl, care se aduc axenic peste cei 225 μl 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 inoculate se incubă timp de 24 - 60 ore, la temperaturi care variază între 24 - 28°C, în funcție de tipul de tulpini testate. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile: stratului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, 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. Cei 15,8 ml de mediu necesari pentru formarea unui strat detector pentru determinarea producerii de siderofori cu o grosime de 2 mm se distribuie pe un capac de placă de microtitrare (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA). Pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri, în care partea inferioară este o membrană de ultrafiltrare (MultiScreen® Filter Plate with Ultracel®-10 Membrane, Merck Millipore, Merck, Darmstadt, Germania) se distribuie câte 245 μ l de mediu decoct de cartof – glucoză – poloxamer, incluzând substanțele care au rol de exo-semnale, pentru a forma un strat cu grosime de 6 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 24 - 60 ore, la aceeași

temperatură ca și plăcile cu un singur godeu, în care microorganismele interacționează. Din 12 în 12 ore se preiau imaginile: stratului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, în fiecare godeu, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).

Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii se prelucrează cu ajutorul softului specializat, *open acces*, Colonyzer (Lawless *et al.* 2010, BMC Bioinformatics, 11, 287). Se obțin date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office, Microsoft, Redmond, WA, SUA), separat pentru dezvoltarea coloniilor și pentru formarea plăcii de decolorare a culorii complexului albastru format de ionii de fier cu CAS-HDTMA (sub acțiunea sideroforilor produși de microorganisme). Se compară suprafețele coloniilor și, respectiv ale plăjelor de decolorare, 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 producerea sideroforilor care extrag fierul din complexul cu CAS-HDTMA și decolorează local stratul detector.

Exemplul 2. Se realizează un mediu agarizat cu hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, care va fi folosit ca strat detector pentru determinarea producerii de compuși care solubilizează fosforul. Se solubilizează la cald 15 g de agar în circa 850 ml de apă distilată, se adaugă 5 grame de hidroxiapatită (Sigma-Aldrich) care se suspendă prin agitare viguroasă, se completează mediul la 1000 ml cu apă distilată și se sterilizează prin autoclavare. Mediul sterilizat se răcește. Se preiau aseptice 15,8 ml din mediul agarizat preparat ca mai sus, menținut în stare lichefiată prin termostatare la 50°C, care se distribuie în condiții axenice pe o placă de microtitrare cu un singur godeu (CELLSTAR® OneWell Plate™, Greiner Bio-One) pentru a forma un strat detector de 2 mm grosime.

Ca mediu de cultivare se realizează un mediu care conține la 1 litru: glucoză 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g; NaCl 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; KCl 0,2 g; extract de drojdie 0,5 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g și $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g. (Reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). Mediul se hidrogelifică cu 30% Poloxamer 407 (Pluronic® F127, BASF) și se sterilizează. Se suplimentează 99,5 ml de mediul

sterilizat de mai sus, lichefiat prin răcire la 6°C, prin adăugarea aseptică a 0,5 ml soluție acetonică, sterilizată prin filtrare, care conține $15 \cdot 10^{-5}$ moli de GR24 (Chiralix). Concentrația finală de GR24 în mediu hidrogelifiat este $15 \cdot 10^{-6}$ M. Se procedează apoi ca în exemplu 1.

Exemplu 3. Se realizează mediul agarizat cu hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, utilizat ca strat detector pentru determinarea producerii de compuși care solubilizează fosforul, și mediul de cultivare a microorganismelor, la fel ca în exemplul 2 de mai sus. 99,5 ml din mediul de cultură sterilizat și hidrogelifiat, lichefiat prin răcire la 6°C, se suplimentează cu o soluție acetonică care conține un amestec echimolar de acid salicilic, acid 2-hidroxibenzoic (Sigma-Aldrich), și GABA, acid gama-aminobutiric (Sigma-Aldrich), fiecare în concentrații de $1 \cdot 10^{-5}$ M. Concentrația finală de acid salicilic și de GABA în mediu hidrogelifiat este $1 \cdot 10^{-6}$ M. Se procedează apoi ca în exemplu 1.

Exemplu 4. Se realizează un mediu agarizat cu silicatul de magneziu sintetic $\text{MgO}:\text{xSiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, care va fi folosit ca strat detector pentru determinarea producerii de compuși care solubilizează siliciul. Se solubilizează la cald 15 g de agar în circa 850 ml de apă distilată, se adaugă 5 grame de silicat de magneziu sintetic (Florisil[®], <200 mesh, Sigma-Aldrich) care se suspendă prin agitare viguroasă, se completează mediul la 1000 ml cu apă distilată și se sterilizează prin autoclavare. Mediul sterilizat se răcește. Se preiau aseptic 15,8 ml din mediul agarizat preparat ca mai sus, menținut în stare lichefiată prin termostatare la 50°C, care se distribuie în condiții axenice pe o placă de microtitrare cu un singur godeu (CELLSTAR[®] OneWell Plate[™], Greiner Bio-One) pentru a forma un strat detector de 2 mm grosime.

Ca mediu de cultivare se realizează 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; glucoză 2 g; și nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO_4 1 mM; CaCl_2 0,1 mM; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3×10^{-9} M; H_3BO_3 4×10^{-7} M; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 3×10^{-8} M; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-8} M; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8×10^{-8} M; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-8} M; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-6} M. (Reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). Se realizează mai întâi mediul cu principalele săruri și glucoza, se aduce pH la 7,4 cu NaOH, se sterilizează prin autoclavare, și apoi se adaugă micro-elementele, prin diluarea unor soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare. Apa folosită este apă miliQ, produsă prin osmoză inversă și ultrafiltrare. Mediul se hidrogelifiează cu 30% Poloxamer

407 (Pluronic® F127, BASF) și se sterilizează. Se suplimentează 99,5 ml de mediul sterilizat de mai sus, lichefiat prin răcire la 6°C, prin adăugarea aseptică a 0,5 ml soluție acetonică, sterilizată prin filtrare, care conține $15 \cdot 10^{-5}$ moli de GR24 (Chiralix). Concentrația finală de GR24 în mediu hidrogelificat este $15 \cdot 10^{-6}$ M. Se procedează apoi ca în exemplu 1.

Exemplu 5. Se procedează ca în exemplu 4, numai că mediu hidrogelificat se suplimentează cu acid salicilic și de GABA în concentrație finală de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Exemplu 6. Se procedează ca în exemplu 4, numai că mediu hidrogelificat se suplimentează cu DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-onă, (Fragmenta, Monmouth Junction, NJ, SUA) în concentrația finală de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Exemplu 7. Se prepară sferile coloidale monodisperse impregnate molecular, utilizate pentru filmul detector (de cristal polimeric coloidal fonic), prin polimerizare în emulsie, fără emulgator. Într-un balon cu fund plat de 1000 ml cu 4 găuri, prevăzut cu un condensator de reflux, ax de amestecare teflonat antrenat de un agitator mecanic, termorezistență pentru măsurarea temperaturii și o intrare de azot, se aduc 20 ml apă pură, dublă distilată în distilator din cuarț. În apă se adaugă 25 ml metil-metacrilat, 0,24 g acrilamidă și 0,30 g acid gibberelic (Reactivi de la Sigma-Aldrich). Soluția se de-oxigenează prin barbotare de azot pentru 30 min, la o agitare de 300 rpm. După de-oxigenare la același nivel de agitare, se crește temperatura la $80 \pm 1^\circ\text{C}$, și se injectează 15 ml de soluție care conține 0,6 g de peroxidisulfat de potasiu. Reacția se menține la refluxare pentru 45 min, După polimerizare, sferile coloidale impregnate molecular se separă de emulsia rezultată prin centrifugare la $500 \times g$ pentru 10 min. Pentru a înlătura moleculele matriță folosite pentru impregnarea moleculară sferile coloidale au fost spălate repetat, cu soluții de acid acetic – metanol - apă (1:4:4), soluție apoasă de metanol 50% (v/v) și apă dublu distilată sterilă. Sferile coloidale impregnate molecular au fost dispersate aseptice în apă dublu distilată sterilă, la o concentrație de 0,3% (m/v) și apoi trecute aseptice într-o placă Petri Ø140 mm sterilă. În suspensia de sfere coloidale se introduc plăcuțe de sticlă de microtitrare (Microplates SuperClean, Arrayit, Sunnyvale, CA, SUA) pe care se formează în timp de 24 ore cristale de sfere coloidale impregnate molecular. Cristalele de sfere coloidale impregnate molecular se preiau cu un film adeziv în condiții aseptice (Seal-It 100™ Automated Adhesive Sealer, Thermo Fisher Scientific). Filmul adeziv se transferă aseptice pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu, și formează stratul detector, cu o

grosime de 2 mm, cu răspuns specific, evidențiable printr-o reacție de culoare la prezența acidului giberelic. În prezența moleculei cu care au fost impregnate molecular (în acest caz acidul giberelic) rețeaua tridimensională a hidrogelului se strânge, cu modificarea lungimii de undă la care lumina suferă un fenomen de difracție în rețeaua nano-structurată de cristal fonic polimeric. Această modificare a lungimii de undă de difracție este percepută ca o modificare a culorii matricei de cristal fonic.

Peste filmul detector de cristal fonic se adaugă mediu decoct de cartof – glucoză – poloxamer, suplimentat cu GR24 în concentrație finală de $5 \cdot 10^{-6}$ M. Se procedează în continuare ca în exemplul 1.

Exemplul 8. Se procedează ca în exemplu 7, cu următoarele două diferențe: sferile coloidale se impregnază cu acid indolil-acetic, iar mediul decoct de cartof – glucoză – poloxamer se suplimentează cu DIMBOA, în concentrația finală de $2 \cdot 10^{-6}$ M.

Exemplu 9. Se procedează ca în exemplu 7, cu următoarele două diferențe: sferile coloidale se impregnază cu acid abscisic (Sigma-Aldrich), iar mediul decoct de cartof – glucoză – poloxamer se suplimentează cu amestec echimolar acid salicilic - GABA, în concentrația finală de $5 \cdot 10^{-6}$ M fiecare.

Exemplu 10. Se procedează ca în exemplu 7, cu următoarele două diferențe: sferile coloidale se impregnază cu zeatină (*trans*-zeatin, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, SUA), iar mediul decoct de cartof – glucoză – poloxamer se suplimentează DIMBOA, în concentrația finală de $2 \cdot 10^{-6}$ M.

Exemplu 11. Se procedează ca în exemplu 7, cu singura diferență că impregnarea moleculară a sferelor se realizează cu putresceină (Sigma-Aldrich).

Exemplu 12. Se procedează ca în exemplu 7, cu următoarele diferențe: sferile coloidale se impregnază cu oligalacturonide cu 10 resturi de galacturonosil legate α -1,4 (oligozaharine); mediul hidrogelifiat este mediul M9 în care sursa de carbon este pulbere micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac; mediul hidrogelifiat se suplimentează DIMBOA, în concentrația finală de $5 \cdot 10^{-6}$ M. Oligozaharinele se obțin prin purificarea pe coloane de schimbători de ioni DEAE-Sephadex (Sigma-Aldrich) a unui hidrolizat de acid poligalacturonic (Sigma-Aldrich) cu pectin-liază din *Aspergillus japonicus* (Sigma-Aldrich).

Revendicări

Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: depunerea aseptică pe o placă sterilă de micro-titrare cu un singur godeu a unui strat detector, cu o grosime de 2 mm, cu răspuns specific, evidențiable printr-o reacție de culoare, la compuși cu rol de biostimulare a plantelor cultivate; adăugarea aseptică peste stratul detector a unui mediu de cultură sterilizat, cu o grosime de 6-7 mm, hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, și în care se omogenizează soluții sterilizate prin ultrafiltrare, din substanțele care au rol de exo-semnale, prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste sau, respectiv, de analogi biomimetici ai acestor exo-semnale; inocularea în condiții axenice a stratului superior de mediu de cultură hidrogelifiat, cu 12 tulpini / izolate de testat, distribuite randomizat în 8 repetiții; incubarea timp de 24 - 60 ore a plăcii de microtitrare, la temperaturi de 24-28°C, cu preluarea imaginilor: stratului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare, din 12 în 12 ore; realizarea în paralel a 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, pe o placă de microtitrare cu 96 godeuri, în care partea inferioară este o membrană de ultrafiltrare, așezată peste stratul detector, cu răspuns specific, evidențiable printr-o reacție de culoare, la compuși cu rol de biostimulare a plantelor cultivate, și care conține în fiecare godeu aceeași grosime de mediul de cultură incluzând substanțe cu rol de exo-semnale, sau analogi biomimetici ai acestor semnale, hidrogelifiat cu un tribloc co-polimer; incubarea timp de 24 - 60 ore a plăcii de microtitrare martor, la temperaturi de 24-28°C, cu preluarea imaginilor: stratului detector din partea de jos și, respectiv, a coloniilor de microorganisme dezvoltate pe stratul superior, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare, din 12 în 12 ore; analiza imaginilor preluate de sistemul de prelevare a imaginii, 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 producerea compușilor de interes, evidențiați specific de stratul detector.

2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** stratul detector este un mediu agarizat care include: indicatori de complexare a fierului pentru determinarea producerii de siderofori, cum este de exemplu mediul cu Chrome azurol S (CAS) și bromură de hexadeciltrimetilamoniu (HDTMA), sau săruri de fosfat anorganic insolubil, ca de exemplu hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sau săruri de siliciu insolubil, cum este de exemplu silicatul de magneziu sintetic $\text{MgO}:\text{xSiO}_2.\text{H}_2\text{O}$, sau un film care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic detector.

3. Strat detector conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** filmul care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic se obține prin preluarea cu un film adeziv, de pe o suprafață de sticlă, a unei matrici de sfere coloidale impregnate molecular, formată pe respectiva suprafață prin cristalizarea unei suspensii din respectivele sfere coloidale impregnate molecular, preparate prin polimerizare în emulsie fără agent emulsifiant.

4. Film care include un strat de cristal polimeric coloidal fonic conform revendicării 3 **caracterizat prin aceea că** moleculele folosite pentru impregnarea moleculară a sferelor coloidale sunt: acid indolic-3-acetic, acid giberelic, zeatină, acid abscisic, atunci când se urmărește detectarea consorțiilor de microorganisme care produc fitohormoni; putresceina sau oligalacturonide cu 10 resturi de galacturonosil legate α -1,4, pentru identificarea consorțiilor de microorganisme modulatori ai căilor metabolice implicate în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici;

5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** soluțiile, sterilizate prin filtrare, de substanțe cu rol de exo-semnale prin care planta favorizează formarea de asociații mutualiste, sau de analogi biomimetici ai acestor semnale, se omogenizează în mediul hidrogelificat după lichefierea acestor medii prin răcire la 4-6°C;

6. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** se omogenizează în mediul hidrogelificat și lichefiat următoarele soluții de substanțe, cu rol de exo-semnale / analogi biomimetici ai acestora, în următoarele concentrații finale în mediul hidrogelificat lichefiat prin răcire: GR24, (3aR*,8bS*,E)-3-(((R*)-4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-iloxi)metilen)-3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno[1,2-b]

furan-2-onă, analog de strigolactone, în concentrații de 5 până la $15 \cdot 10^{-6} \text{M}$; DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-onă, în concentrații de 2 până la $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$; amestec echimolar de acid salicilic, acid 2-hidroxibenzoic, și GABA, acid gama-aminobutiric, fiecare în concentrații de 1 până la $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

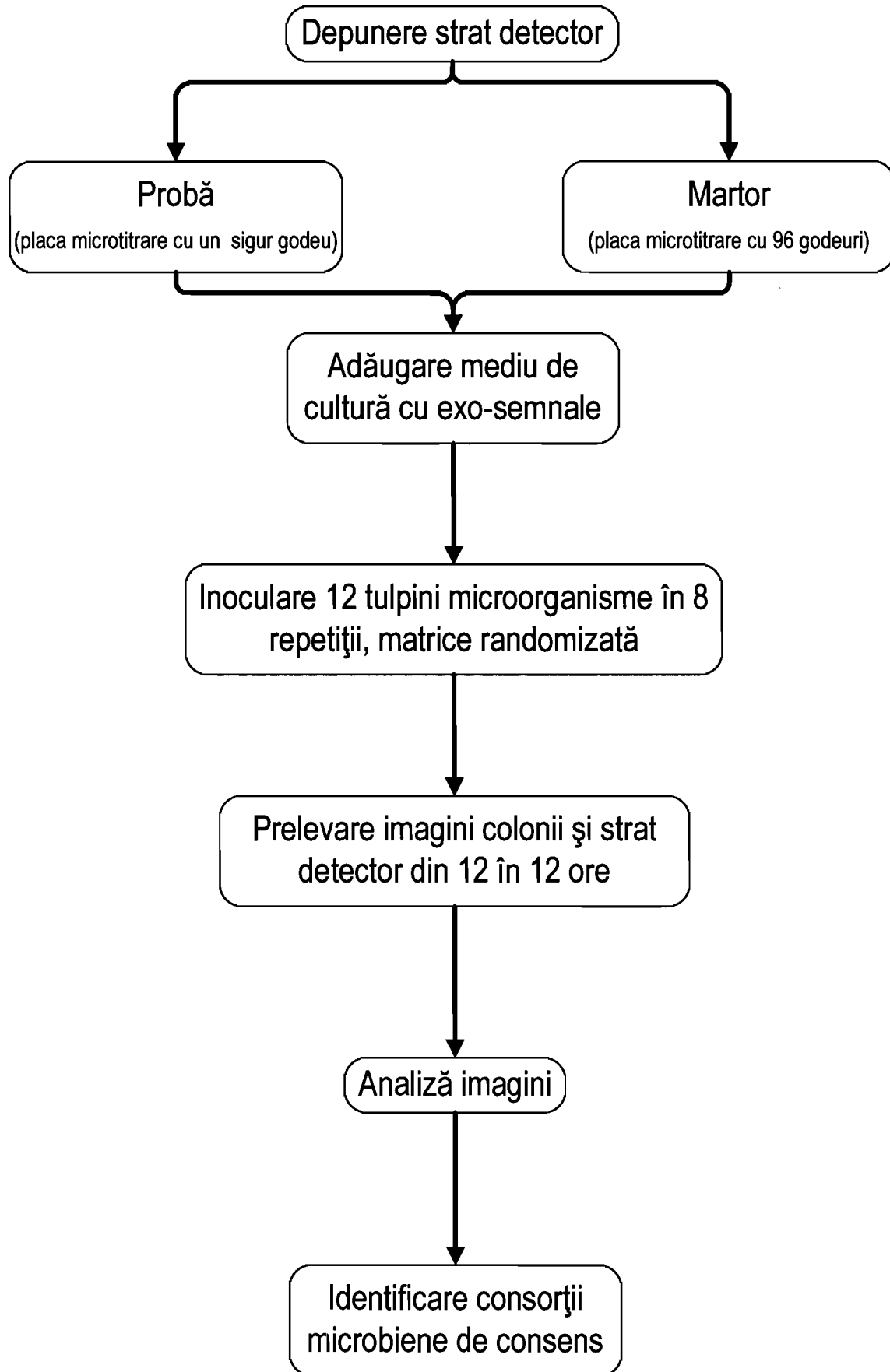


Figura 1