RAPORT ŞTIINŢIFIC

Proiect nr. 300/01.10.2007, cod CNCSIS ID_837, titlul

CERCETARI PRIVIND ACTIVITATEA UNOR COMPUSI BIOLOGICI CU APLICATII IN PROTECTIA ECOSISTEMELOR AGRICOLE

Etapa Unică 2009

Echipa de cercetare: Irina Grebenişan, Gh. Câmpeanu, Carmen Cîmpeanu, Roxana Alexe Sălcianu, Violeta Olteanu Marin

Caracterizarea genetică a tulpinilor microbiene utilizate în diverse scopuri constituie una dintre direcţiile prioritare de cercetare în domeniu. Aceasta permite, pe de o parte, folosirea datelor atunci când tulpinile microbiene sunt utilizate pentru obţinerea unor biopreparate şi, pe de altă parte, atunci când se doreşte elaborarea unor metode de identificare şi diferenţiere rapidă a speciilor.

În vederea brevetării unor biopreparate pe bază de microorganisme antagoniste destinate combaterii biologice a unor fungi fitopatogeni – tericoli, foliari sau de depozit, se impune o caracterizare foarte riguroasă a tulpinilor de microorganisme. De aceea, direcţiile de cercetare care au fost abordate în cadrul acestei etape a proiectului au vizat aspecte de cercetare fundamentală de biologie moleculară pentru caracterizarea genetică a tulpinilor bacteriene: cariotiparea.

Izolarea ADN cromosomal bacterian cu kitul Wizard Genomic DNA Purification Promega de la bacterii Gram pozitive şi Gram negative

Kitul este destinat izolării ADN din celule bacteriene Gram pozitive şi Gram negative, de levuri, celule vegetale şi animale, celule din culturi de ţesuturi şi din celule albe sangvine. Kitul Wizard Genomic DNA Purification se bazează pe un proces de izolare constituit din patru etape. Prima etapă constă în liza celulelor şi nucleilor. Următoarea etapă constă în degradarea ARN prin tratament enzimatic cu RN-ază. Proteinele celulare sunt îndepărtate în etapa de precipitare cu săruri. Soluţia de ADN genomic cu greutate moleculară mare este concentrată prin precipitarea cu alcool izopropilic. De asemenea, sunt îndepărtate şi sărurile din soluţie. ADN purificat cu acest kit poate fi utilizat pentru o gamă mare de aplicaţii inclusiv în experimente de amplificare (PCR), digestie cu enzime de restricţie, hibridizare prin membrană (Southern şi dot/slot blots).

Materiale şi reactivi

-tuburi de centrifugă Eppendorf de 1,5 ml
-baie de apă 37^{o}C, 65^{o}C, 80^{o}C
-alcool izopropilic la temperatura camerei
-etanol 70% la temperatura camerei
-EDTA 50 mM, pH=8,0 (pentru bacterii Gram pozitive)
-lizozim 10 mg/ml (pentru bacterii Gram pozitive)
-lizostafin 10 mg/ml (pentru bacterii Gram pozitive)

Modul de lucru

1. Se centrifughează 2 minute la 13.000 rpm 1 ml cultură bacteriană tânără obţinută prin cultivare în mediu LB timp de 18 h la 30 sau 37^{o}C;
2. Se aspiră supernatantul, apoi pentru bacterii Gram pozitive se trece la etapa a 3 a, iar pentru bacterii Gram negative la etapa a 6 a;
3. Sedimentul celular se resuspendă în 480 µl EDTA 50 mM, pH=8,0;
4. Se adaugă 120 µl lizozim sau lizostafin 10 mg/ml şi se suspensionează uşor cu micropipeta automată; acest pretratament facilitează ruperea legăturilor β-1,4 glicozidice dintre acidul N cetilmuramic şi N acetilglucozamina din peretele celular şi permite lizarea eficientă a celulelor; Pentru anumite specii de *Staphylococcus* este necesar pentru degradarea pereţilor celulari un amestec de 60 µl lizozim 10 mg/ml şi 60 µl lizostafin 10 mg/ml. Pentru tulpini bacteriene Gram pozitive cum sunt *Bacillus subtilis, Micrococcus*

luteus, Nocardia sp., Rhodococcus rhodochrous şi *Brevibacterium albidium* tratamentul cu lizozim este eficient;
5. Se incubează 30 – 60 minute la 37^{o}C, apoi se centrifughează 2 minute la 13.000 rpm şi se aspiră supernatantul;
6. Se adaugă 600 µl soluţie pentru liză şi se suspensionează uşor cu micropipeta până suspensia devine omogenă;
7. Se incubează 5 minute la 80^{o}C pentru a facilita liza celulelor, apoi se răceşte la temperatura camerei;
8. La lizatul celular se adaugă 3 µl soluţie RN-ază, apoi tubul se inversează de două-cinci ori pentru suspensionare;
9. Se incubează 15-60 minute la 37^{o}C, apoi se răceşte la temperatura camerei;
10. La lizatul celular tratat cu RN-ază se adaugă 200 µl soluţie pentru precipitarea proteinelor şi se vortexează la viteza maximă timp de 20 secunde pentru amestecarea soluţiei de precipitare;
11. Proba se incubează pe gheaţă 5 minute;
12. Se centrifughează 3 minute la 13.000 rpm;
13. Se transferă supernatantul (trebuie aspirat foarte încet pentru a se evita contaminarea cu proteine) ce conţine soluţia de ADN într-un tub Eppendorf nou în care s-au introdus 600 µl alcool izopropilic (păstrat la temperatura camerei);
14. Se amestecă uşor prin inversarea tubului până când ADN-ul formează o masă vizibilă;
15. Se centrifughează 2 minute la 13.000 rpm;
16. Se aspiră cu grijă supernatantul şi se aruncă, păstrându-se sedimentul; tubul se întoarce cu gura în jos şi se aşează pe un prosop de hârtie pentru a fi absorbit tot alcoolul; se adaugă 600 µl etanol 70% (păstrat la temperatura camerei) şi se inversează de câteva ori pentru a spăla sedimentul de ADN;
17. Se centrifughează 2 minute la 13.000 rpm şi se aspiră cu grijă etanolul;
18. Tubul se întoarce cu gura în jos şi se aşează pe un prosop de hârtie pentru a fi absorbit tot alcoolul, apoi se lasă 10-15 minute să se evapore la temperatura camerei ;
19. Se adaugă 100 µl soluţie pentru rehidratarea ADN şi se incubează 1 oră la 65^{o}C; periodic se amestecă uşor tubul; ADN poate fi rehidratat şi prin incubarea peste noapte la temperatura camerei sau la 4 ^{o}C;
20. Soluţia de ADN se păstrează la frigider până se utilizează pentru experimente ulterioare.

Izolarea ADN plasmidial bacterian

În vederea localizării genelor care codifică pentru sinteza compuşilor inhibitori s-a utilizat tehnica izolării ADN plasmidial prin metoda lizei alcaline (Maniatis, 1982). Această metodă este derivată de la metoda lizei alcaline descrisă de Birnboim şi Doly (1979) pentru izolarea plasmidelor cu greutate moleculară mică. Verificarea ADN izolat de la tulpinile bacteriene s-a realizat prin electroforeză în gel de agaroză 0,8%.

Modul de lucru

1. Tulpinile bacteriene se cultivă în bulion LB timp de 18-24 ore la 37^{o}C, cu agitare 120 rpm, apoi celulele se depun prin centrifugare;
2. Sedimentul celular rezultat este reluat în 1 ml soluţie I ce conţine lizozim (2-5 mg/ml în funcţie de specia bacteriană utilizată) şi se incubează 5-10 minute la temperatura camerei;
3. Liza celulară se realizează prin adăugarea a 2 ml soluţie II, preparată înainte de utilizare, şi menţinerea pe gheaţă 10 minute;
4. Amestecul este neutralizat prin adăugarea a 1,5 ml soluţie III, se agită uţor prin inversarea tubului şi se menţine pe gheaţă 10 minute;
5. Resturile celulare şi ADN cromosomal se sedimentează prin centrifugare la 12000 x g timp de 30 minte, la rece;
6. La supernatant se adaugă 0,6-1 volum de alcool izopropilic ce asigură precipitarea ADN plasmidial. După menţinerea timp de 15 minute la temperatura camerei, ADN este depus prin centrifugare la 15000 rpm timp de 20 minute, spălat cu 1 ml etanol 70% şi recentrifugat 10 minute la 10000;
7. Sedimentul de ADN plasmidial este reluat într-un volum mic de TE de păstrare ce conţine RN-ază (20 µg/ml), pentru îndepărtarea resturilor de ARN contaminante.

Medii şi soluţii: bulion Luria Bertani; soluţia I: Tris HCl 25 mM, pH= 8,0, EDTA 10 mM, glucoză 50 mM; soluţia II: NaOH 0,2 N, SDS 1%; soluţia III: acetat de potasiu 5M – 6 volume, acid acetic glacial – 1,15 volume, apă distilată – 2,85 volume; alcool etilic absolut; tampon TE: Tris HCl 10 mM, pH= 8,0, EDTA 1 mM.

Verificarea electroforetică a ADN

Electroforeza reprezintă o metodă fizico-chimică analitică şi preparativă, care se bazează pe fenomenul migrării unor particule încărcate electric într-un mediu solid sub acţiunea unui câmp electric extern.

Modul de lucru

1. Se cântăreşte cantitatea necesară de agaroză pentru realizarea unui gel de concentraţie 0,8% pentru 30 ml TBE 1x;
2. Agaroza se adaugă peste 30 ml TBE 1x se introduce în cuptorul cu microunde să se topească, apoi se adaugă 2 µl bromură de etidiu;
3. Se pregăteşte cuva de electroforeză: se montează pieptănul şi spaţiatoarele, apoi se toarnă cu grijă agaroza (când ajunge la o temperatură de 45-50^{o}C). După ce gelul s-a solidificat se înlătură pieptănul şi spaţiatoarele cu grijă, apoi se adaugă tampon de migrare TBE 1x astfel încât să fie acoperită toată suprafaţa gelului;
4. Probele de ADN se prepară în tuburi Eppendorf astfel: se amestecă 10 µl ADN cu 3 µl tampon de încărcare ce conţine albastru de bromfenol 0,4% şi sucroză 55% (conferă densitate amestecului), pentru vizualizarea benzilor de ADN în timpul migrării – marker de migrare;
5. Se încarcă gelul (godeurile) cu grijă şi se notează numărul probei şi linia unde a fost introdusă;
6. Se conectează la sursa de curent (5 V/cm);
7. După migrare gelul se examinează la transiluminator UV pentru observarea benzilor de ADN. Timpul necesar de migrare se stabileşte în funcţie de concentaţia gelului astfel: pentru un gel de agaroză 1% tensiunea este de 100 V timp de 1 oră.

În scopul caracterizării genetice a tulpinilor bacteriene izolate (cu efect inhibitor faţă de fungii fitopatogeni), a localizării genelor care codifică pentru sinteza compuşilor inhibitori s-a utilizat tehnica izolării ADN plasmidial prin metoda lizei alcaline. În urma testării electroforetice în gel de agaroză 0,8% a ADN izolat de la tulpinile IGB_1 şi IGB_2 s-a constat că acestea nu conţineau plasmide, ceea ce sugerează că genele implicate în codificarea biosintezei compuşilor inhibitori sunt localizate pe cromosomul bacterian (fig. 1).

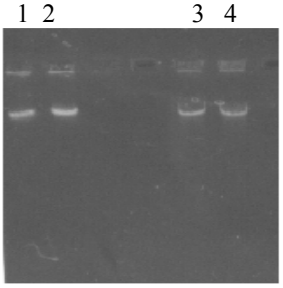

Fig. 1. Aspect electroforetic al ADN extras din diferite tulpini de *Bacillus sp.* care au manifestat efect inhibitor faţă de fungii fitopatogeni: IGB_1 (liniile 1, 2),IGB_2 (liniile 3, 4)

Elaborarea metodologiilor pentru obtinerea cromosomilor intacti si analiza cariotipului
Electrocariotiparea – tehnica FIGE

Electrocariotiparea – analiza profilurilor electroforetice a cromosomilor bacterieni presupune parcurgerea următoarelor etape:

Izolarea ADN bacterian pentru FIGE (field inversion gel electrophoresis)

Prima zi:

1.Celulele bacteriene din 10 ml suspensie de 20 ore se depun prin centrifugare 10 min. la 6.000 rpm şi se reiau în 0,2 ml tampon ES (EDTA 25 mM, NaCl 75 mM).

2.Separat se prepară câte 1 ml agaroză LMP (Sigma) 1,5% în acelaşi tampon ES (pentru fiecare tulpină bacteriană analizată).

3.Se amestecă rapid suspensia bacteriană cu soluţia de agaroză menţinută pe baie de apă la 50oC, iar amestecul obţinut se introduce cu o pipetă în dispozitivul de formare a bloculeţelor.

4.Se menţine amestecul la rece timp de 30 minute, apoi cu ajutorul unui bisturiu se taie bloculeţe de circa 1 mm grosime.

5. Bloculeţele se introduc într-o eprubetă care conţine 3 ml tampon de liză 1 (Tris HCl 6 mM, EDTA 100 mM, NaCl 1 M; Brij 58 0,5% (m/v), deoxicolat de sodiu 0,2% (m/v), sarcozilat de sodiu 0,5% (m/v), pH 7,5) ce conţine lizozim (0,5 mg/ml) şi se incubează peste noapte la 37^{o}C.

A 2-a zi:

6.Se îndepărtează tamponul de liză 1 şi se adaugă tamponul de liză 2 (sarcozilat de sodiu 1% (m/v), EDTA 500 mM, pH 9,5), care conţine proteinază K (500 µg/ml).

7. Se incubează peste noapte la 56^{o}C.

A 3-a zi:

8.Se îndepărtează tamponul de liză 2 şi se adaugă acelaşi tampon, continuându-se incubarea peste noapte la 56^{o}C.

A 4-a zi:

9.Se îndepărtează soluţia de liză, iar bloculeţele se spală de 3 ori cu tampon TE (Tris HCL 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5), la rece.

10.Bloculeţele pot fi utlizate imediat sau pot fi păstrate la 4^{o}C timp de câteva luni.

Tratarea probelor de ADN cu enzime de restricţie

1.Se repartizează în tuburi Eppendorf câte trei bloculeţe şi se spală repetat cu apă distilată sterilă.

2.Peste bloculeţele astfel pregătite se adaugă 50 µl amestec pentru restricţia enzimatică (tampon de incubare pentru enzimele de restricţie alese pentru experimente - Hind III, Sma I şi Not I şi 30U enzimă).

3.Se incubează la temperatura optimă de acţiune a enzimei: 37^{o}C pentru Hind III şi Not I şi 25^{o}C pentru Sma I.

Prezentarea echipamentului pentru tehnica FIGE

Echipamentul pentru electroforeza în câmp inversat (Field Inversion Gel Electrophoresis - FIGE) este format din:

1.computer care permite programarea timpilor de migrare pentru direcţiile înainte şi înapoi, timpul total de migrare, numărul de cicluri

2.aparat de electroforeză pentru acizi nucleici în gel de agaroză în sistem submers

3.inversor de câmp electric comandat de computer.

Fig. 2. Echipament pentru FIGE

Elaborarea metodologiei pentru analiza electroforetică a cariotipului microorganismelor
Cariotiparea microorganismelor

Modul de lucru

1.Separarea fragmentelor de ADN se realizează în gel de agaroză 1,2% (în care s-a introdus bromura de etidiu) în tampon TBE 0,5x (Tris HCl 45 mM, acid boric 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3).
2.După răcirea gelului se îndepărtează pieptenul, iar în godeuri se introduc cu atenţie bloculeţele pregătite anterior.
3.Se acoperă godeurile cu o cantitate mică de agaroză 1,2%.
4.Migrarea probelor de ADN se realizează la 15^{o}C în diferite condiţii, modificând atât timpii de migrare, cât şi intensitatea curentului electric aplicat.
5.Profilurile electroforetice obţinute pentru tulpinile microbiene proprii au fost comparate cu cele obţinute pentru marker-ul comercial: Pulse Marker 0,1-200 kb produs de Sigma.

Parametrii pentru electrocariotipare

- timp iniţial de migrare înainte (foreward – Fwi) = 10 sec
- timp final de migrare înainte (foreward – Fwf) = 120 sec
- pauza pentru direcţia înainte (Pfw) = 1/10 Fwi
- timp de migrare invers (reverse – Rv) = 1/3 Fwi
- pauza pentru direcţia invers (Prv) = 1/10 Rv
- timpul de migrare 24 h
- premigrare 10 min la 30 V
- migrare finală 30 V

Metodă pentru analiza microorganismelor producătoare de biosurfactanţi
Screeningul microorganismelor producătoare de biosurfactanţi

Microorganismele utilizează o varietate mare de compuşi organici ca sursă de carbon şi energie pentru creşterea lor. Atunci când sursa de carbon este un substrat insolubil de exemplu o hidrocarbură (C_xH_y), microorganismele facilitează difuzia acestui compus în celulă prin producerea biosurfactanţilor. Unele bacterii şi levuri secretă surfactanţi ionici care emulsionează substratul – hidrocarbura în mediul de cultură.

Modul de lucru
1. Pentru realizarea preinoculului tulpinile bacteriene se cultivă 18-24 h la 30^{o}C în condiţii de agitare 120 rpm în mediu lichid pentru producerea de iturin.
2. Din preinocul se inoculează câte 10 ml mediu pentru iturin în baloane Erlenmeyer şi se incubează în aceleaşi condiţii de cultivare timp de cinci zile.
3. După cele cinci zile de incubare, mediile de cultură se centrifughează 10 minute la 8.000 rpm pentru sedimentarea celulelor bacteriene, apoi pH-ul supernatantului se ajustează la 2,0 cu HCl 1N, pentru precipitarea peptidelor.
4. După incubarea timp de 1 h la 4^{o}C precipitatul se colectează prin centrifugare 10 minute la 10.000 rpm şi se supune extracţiei cu alcool metilic 1/10 din volumul mediului de cultură supus extracţiei.
5. Extractele obţinute se supun separării prin cromatografie în strat subţire pe plăci de Silicagel, folosind pentru migrare un amestec de cloroform /etanol /metanol /apă (70/ 35/ 30/ 15, vol/ vol/ vol/ vol) şi relevare cu o soluţie acetonică de ninhidrină 0,3%.

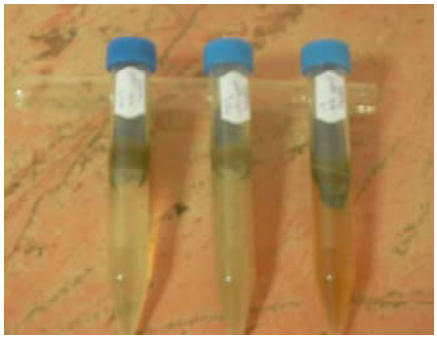

Fig. 2 Martor a) MSM1, b) MSM2, c) LB

Fig. 3 a) MSM1+IGB2, b)MSM2+IGB2, c)LB+IGB2

Studii privind biocontrolul faţă de fungii patogeni *Alternaria* spp., *Fusarium oxysporum* şi *Rhizoctonia solani*

În natură, unele microorganisme favorizează dezvoltarea altora, formând asociaţii care le permit coevoluţia în ecosistem, în timp ce altele se exclud reciproc, prin mecanisme de antagonism. Microorganismele cu importanţă în combaterea biologică a bolilor plantelor cultivate au un mod de acţiune complex. Antagonismul agenţilor de combatere biologică faţă de fungi fitopatogeni se datorează atât acţiunii unor produşi de metabolism secundar (antibiotice), cât şi distrugerii directe prin micoparazitism.

Pentru a testa eficacitatea agenţilor de combatere biologică trebuie realizate pe lângă testele *in vitro* de apreciere a antagonismului faţă de fungii fitopatogeni şi teste *in vivo*. Astfel se poate aprecia dacă tulpinile de microorganisme sunt competitive.

Modul de lucru

1. Tulpinile de bacili obţinute din probe de sol au fost selectate şi cultivate timp de 18 ore la 30^{o}C în mediu lichid pentru stimularea producerii compuşilor inhibitori;
2. Se cântăresc câte 100 g sol şi se repartizează în trei pahare de plastic pentru fiecare variantă experimentală;
3. *Alternaria sp.*
4. Pentru varianta V1 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB1; pentru varianta V2 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB1 + 1000 µl suspensie fungică de *Alternaria sp.*; pentru varianta V3 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie fungică de *Alternaria sp.*;
5. Pentru varianta V1 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB2; pentru varianta V2 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB2 + 1000 µl suspensie fungică de *Alternaria sp.*; pentru varianta V3 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie fungică de *Alternaria sp.*;
6. Pentru varianta V1 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB1; pentru varianta V2 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB1 + 1000 µl suspensie fungică de *Fusarium oxysporum*; pentru varianta V3 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie fungică de *Fusarium oxysporum*;

7. Pentru varianta V1 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB1; pentru varianta V2 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie bacteriană IGB1 + 1000 µl suspensie fungică de *Rhizoctonia solani*; pentru varianta V3 se pun câte cinci seminţe de tomate sau ardei şi 1000 µl suspensie fungică de *Rhizoctonia solani*;
8. După ce seminţele germinează plăntuţele se stropesc zilnic cu apă;
9. După trei săptămâni se fac aprecierile rezultatelor experimentelor.

După trei săptămâni de la germinarea seminţelor şi creşterea plăntuţelor s-au făcut aprecierile rezultatelor experimentelor:

1. Varianta V1 ce conţine suspensia de bacili – plăntuţele sunt foarte bine dezvoltate, datorită producerii compuşilor ce stimulează creşterea (fitohormonul acid indolil acetic);
2. Varianta V2 ce conţine suspensia de bacili şi suspensia de fungi fitopatogeni *Alternaria sp., Fusarium oxysporum,* respectiv *Rhizoctonia solani* – plăntuţele sunt bine dezvoltate datorită producerii substanţelor antifungice de către bacterii, care au inhibat creşterea fungilor fitopatogeni;

Varianta V3 ce conţine suspensia de fungi *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum,* respectiv *Rhizoctonia solani* – seminţele nu au reuşit să germineze şi să se dezvolte plăntuţe.