



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01159**

(22) Data de depozit: **24.11.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27.02.2015** BOPI nr. 2/2015

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

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

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

• **CONSTANTINESCU FLORICA,
STR.EMANOIL PORUMBARU NR.67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SICUIA OANA, STR.VICINA NR.3, BL.33,
SC.3, AP.153, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **DINU SORINA,
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**WO 2008/031887 A2; US 5055293;
CN 1640266 (A)**

(54) **TULPINA DE *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS*
ANTAGONISTĂ FAȚĂ DE CIUPERCI FITOPATOGENE**



Prezenta invenție se referă la o nouă tulpină de *Brevibacillus laterosporus*, antagonistă față de ciuperci fitopatogene din sol, care prezintă, concomitent, și capacitate ridicată de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor plantelor, și care este destinată utilizării în exploatarea agricole conservative, inclusiv în cele care utilizează mulci format din culturi verzi de protecție.

Sunt cunoscute o serie întreagă de tulpini de bacterii gram-pozitive sporulate, aparținând speciei *Brevibacillus laterosporus* și destinate utilizării în practică.

WO 2008/03887 A2 descrie o tulpină de *Brevibacillus laterosporus*, UNISS18, nepatogenă pentru om, depozitată cu numărul 41419 la NCIMB, care prezintă activitate insecticidă pentru dipterele care sunt vectori ai unor boli umane (*Musca domestica*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles maculipennis* și *Aedes aegypti*). Tulpina este destinată combaterii biologice a acestor diptere, prin aplicare în diferite tipuri de formulări.

US 5055293 se referă la tulpina P5 de *Brevibacillus laterosporus* (număr de depozit ATCC 53694), care este patogenă pentru de o serie întreagă de lepidoptere dăunătoare culturilor agricole și, în special, față viermele vestic al porumbului (*Diabrotica virgifera virgifera*). Tulpina P5 se aplică, ca tratament la sol sau al seminței, pentru limitarea populațiilor lepidopterelor dăunătoare față de care este activă.

CN 1640266 A se referă la un bacteriocid microbian, la metoda de preparare a acestuia și de aplicare. Tulpina de producție inventată este *Brevibacillus laterosporus* G4. Bacteriocidul microbian inventat este preparat prin adoptarea unui procedeu convențional de fermentare shake-flask. Tulpina are o bună acțiune bactericidă, pentru doi patogeni ai plantelor *Fusarium* și *Rhizoctonia*.

Nu s-au descris până în prezent tulpini de *Brevibacillus laterosporus*, care să aibă, concomitent, activitate de antagonism față de agenții fitopatogeni din sol și capacitate de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor plantelor. Astfel de tulpini sunt necesare sistemelor de agricultură conservativă. În cadrul acestor sisteme, lucrările mecanice ale solului sunt reduse, iar solul este acoperit cu cel puțin 30% resturi vegetale. Sistemele de agricultură conservativă reduc eroziunea solului și poluarea apelor de suprafață și din pânza freatică, dar au dezavantajul că mențin solul rece, reducând germinația și dezvoltarea plantelor cultivate, și favorizând dezvoltarea agenților de dăunare, în special, ciuperci fitopatogene din sol, cu spectru larg de acțiune.

În cadrul acestor sisteme de agricultură conservativă, tulpinile de *Brevibacillus laterosporus*, care prezintă atât activitate de antagonism față de agenții fitopatogeni din sol, cât și capacitate de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor plantelor, ar contribui la înlăturarea dezavantajului menționat mai sus, pentru că ar inhiba agenții fitopatogeni din sol, ar proteja plantele de cultură pe care le colonizează și ar asigura un management durabil al resturilor vegetale.

Tulpina 56.1s de *Brevibacillus laterosporus*, cu numărul de depozit DSM 23663, conform invenției, este antagonistă față de ciupercile fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*, prezintă o capacitate ridicată de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor vegetale, datorită producerii de amilază și lactonază AHL, mobilității de migrare și de agregare și formării de biofilme, și asigură creșterea nivelului producțiilor de porumb în sistemele de agricultură conservativă pe bază de mulci bioactiv, în condițiile reducerii folosirii erbicidelor și a arăturii.

Tulpina *Brevibacillus laterosporus* 56.1s prezintă următoarele avantaje:

- creștere bogată pe mediile uzuale utilizate pentru creșterea bacililor gram-pozitivi sporulați;

- formarea de spori cu viabilitate îndelungată; 1
 - capacitatea de a modula formarea consorțiilor microbiene de consens cu alte bacterii utilizate în biopreparate mixte, datorită activității lactonazice prin care influențează semnalele AHL, implicate în realizarea sensibilității de grup; 3
 - acțiune împotriva atacului principalelor ciupercilor fitopatogene de sol; 5
 - mobilitate ridicată, capacitate de a coloniza material vegetal și de a forma biofilme; 7
 - capacitate de colonizare a țesuturilor plantelor în primele faze de vegetație și de protejare împotriva atacului unor agenți fitopatogeni. 7
- Tulpina *Brevibacillus laterosporus* 56.1s (numărul de depozit DSM 23654, DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germania) prezintă acțiune antifungică față de ciupercile fitopatogene din sol și capacitate de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor plantelor. 9
- Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos. 13
- Exemplu.** Tulpina 56.1s de *Brevibacillus laterosporus* a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, dintr-o probă de sol provenit din Bărăganul de sud. Pentru izolarea bacteriei, s-a utilizat agar nutritiv (peptonă - 5 g/l, extract de carne - 3 g/l, agar - 20 g/l, la 1000 ml apă; pH 6,8...7,2), iar pentru cultivare, s-a utilizat mediul Luria-Bertani agarizat (LBA: bactotriptonă - 10 g/l, extract de drojdie - 5 g/l, NaCl - 10 g/l, agar - 20 g/l, la 1000 ml apă; pH 7,5), la o temperatură optimă de incubare de 28°C. 15
- Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 50 de izolate de bacili sporulanți gram-pozitivi, pe baza acțiunii antagoniste față de ciupercile fitopatogene de sol (*Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solarii*, *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*), producerii de amilază și lactonază AHL, mobilității de migrare/swimming și agregare/swarming, formării de biofilme *in vitro*, capacității de colonizare a materialului vegetal, activității de protecție a plantulelor de porumb față de atacul de *Fusarium graminearum*. 17
- În vederea încadrării taxonomice, tulpina 56.1s a fost caracterizată pe baza unei taxonomii polifazice, respectiv, a combinării caracterelor morfologice (tabelul 1), cu cele fiziologice (tabelul 2) și cu cele moleculare (secvența 16S rADN, tabelul 3, profilului de acizi grași din lipidele membranare, tabelul 4). Coroborând toate aceste date, tulpina 56.1s a fost încadrată ca aparținând speciei *Brevibacillus laterosporus*. 19

Tabelul 1 33

Morfologia coloniilor de *Brevibacillus laterosporus* 56.1s pe diferite medii, după cultivare timp de 24 h 35

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii Usa2		
		Culoare	Aspect exterior	Dimensiuni (24 h)
Medii gelificate semisintetice	mediul cu decoct de cartof - glucoză agar (CGA)	brune	rugose, margini neregulate sub forma de filamente	colonii medii
	mediul cu extract de carne (beef extract)	crem	rugose, centrul proeminent, încrețit, margini neregulate	colonii mari
	mediul cu decoct de fasole	crem-brun	rugose, margini neregulate	colonii medii
	mediul cu extract de sol	crem-brun	rugose, margini neregulate	colonii medii

Tabelul 1 (continuare)

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii Usa2		
		Culoare	Aspect exterior	Dimensiuni (24 h)
Medii solide naturale	felii de cartof sterile	brun	ruogoase, margini neregulate, centru cu rugozități fine	colonii mari
Medii lichide	mediul cu decoct de cartof - glucoză	-	peliculă fină la suprafață, ruogoasă, turbiditate slabă	-
	mediul cu extract de carne	-	peliculă fină la suprafață, ruogoasă, turbiditate slabă	-

Tabelul 2

Caracteristicile fiziologice ale tulpinii 56.1s

Testul biochimic	56.1s
Reacția Gram	+
Reacția Voges-Proskauer	±
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Reducerea NO ₃ ->NO ₂	+
Creșterea anaerobă	-
Sursa de carbon:	
- malonat	+
- citrat	+
- propionat	-
- tartrat	+
- trehaloza	+
- glucoza	+
Acidifică:	
- xiloza	+
- glucoza	+
- arabinoza	±
- manitol	+
- rafinoza	+
- celobioza	+
Toleranța la NaCl 7%	+

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin aplicarea unui protocol de lucru caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure - colonii izolate, tehnica însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului bacterian; electroforeză în gel pentru detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 16S rADN prin tehnica PCR și electroforeză în gel; purificarea ADN-ului ribozomal; amplificarea enzimatică a acizilor nucleici înainte de secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-ului codificând pentru 16sRNA. Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele au fost analizate folosind programul *CHROMAS 2.33* (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene NCBI (National Center for Biotechnology Information), s-a realizat cu ajutorul programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3, acestea dovedind o similaritate de 99,8% cu alte tulpini de *Brevibacillus laterosporus*.

Identificarea tulpinii pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank

Tulpina	Lungimea secvenței 16S' rADN ¹	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinii ²
56.1s	840	GACGMCGCT GGCGGCGTGCCTAATACATG	<i>Brevibacillus laterosporus</i> NBRC 15654 - similaritate: 99,8%
		AAGTCGAGCGAGGGTCTTC	
		GGACCCTAGCGCGGACGGGGAGTAACACTAGGCAAC	
		CTGCCTG	
		TNAGCTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTMTACCG	
		GATAGG GTTTTGCTTCCTGAAGCGAAACGGAAA	
		GATGGCGCAAGCTATCACTT ACAGATGGGC	
		CTGCGGCGCA TAGCTAGTT	
		GGTGAGGTMNGGCTCACCAAGGCGACGAT	
		GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG	
		TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC	
		TCCTCGG	
		GAGGCACAGTAGGGAATTTTCCACATGGACGAAATCT	
		GATGGAG	
		CAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCGGTCGTAA	
		AGTTCTGT	
		TGTTGGGAAGAAAAGTGCTATTAAATAAGGTAGCACC	
		TTGA	
		CGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC	
		CAGCGCC GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT	
		GTCCGGAATT ATTGGGCGTAAAGCGCGCGC	
		AGGTGGCTAT GTAAGTCTGA	
		TGTTAAAGCCCGAGGCTCAA	
		CCTCGGTTTCGCATTGGAAAC TGTGTAGCTT	
		GAGTGCAGGA GAGGAAAGTG	
		GTATTCCACGTGTAGCGGTG AAATGCGTAG	
		AGATGTGGAG GAACACCAGT GGCGAAGGCG	
		ACTTTCTGGC CTGTMCTGACACTGAGGCG	
		CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT	
		ACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAG	
		TGCTAGGTGT TAGGGGTTTC AATACCCTTA	
		GTGCCGCAGC TAACGCAATA	

- (perechi de baze - pb); - pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank (număr de referință - procentul de similaritate).

Profilul acizilor grași membranari a fost determinat cu ajutorul unui sistem Sherlock® Microbial ID, prin folosirea procedurii Instant FAME™. Esterii acizilor grași din membrana bacteriană au fost separați pe un cromatograf de gaze GC 6890N (Agilent Technologies), echipat cu injector split/splitless clasic, coloană capilară tip Ultra 2 (cod Agilent 19091B-102, având lungimea de 25 m, diametrul interior de 0,2 mm, faza staționară 5% fenil metil siloxan, grosimea fazei staționare de 0,33 μm) și detector de ionizare în flacără (FID). Softurile utilizate pentru achiziția și prelucrarea automată a datelor cromatografice au fost: GC ChemStation, versiunea B.01.03 [204]/2005, și Sherlock Microbial Identification System, versiunea 6.1/2008. S-au folosit metode cromatografice dezvoltate și validate de producător (MIDI, Inc.), utilizând bibliotecile de profiluri de esteri metilici ai acizilor grași pentru microorganisme aere din mediu (RTSBA6, versiunea 6.0/2008). Ca material de referință,

s-a folosit un amestec etalon de esteri metilici ai acizilor grași cu catenă liniară cu numărul de atomi de carbon în moleculă cuprins între 9 și 20 (etalonare cantitativă pentru metodele cromatografice Sherlock rapide și sensibile). Microorganismele de referință, pentru verificarea protocoalelor microbiologice și chimice de procesare a probelor, au fost *Bacillus subtilis* (tulpina ATCC 6633) și *Stenotrophomonas maltophilia* (tulpina ATCC 13637).

Tabelul 4

Profilul acizilor grași din membrana tulpinii 56.1s

Timp de retenție	Tip acid gras, membranar	Proportie (%)
1,8769	13:0 iso	0,98
1,9018	13:0 anteiso	0,40
2,1668	14:0 iso	3,27
2,2777	14:0	2,26
2,4762	15:0 iso	22,67
2,5055	15:0 anteiso	58,86
2,7257	16:1 w7c alcohol	0,39
2,7959	16:0 iso	2,26
2,8441	16:1 w11c	0,99
2,9135	16:0	1,98
2,9972	15:0 2OH	0,65
3,0475	17:1 iso w10c	0,56
3,1184	17:0 iso	1,53
3,1493	17:0 anteiso	2,88
3,4887	18:1 w9c	0,33

Activitatea antagonistă a tulpinii 56.1s față de diferite ciuperci fitopatogene, cum ar fi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum radialis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Alternaria* spp. s-a analizat *in vitro* prin utilizarea tehnicii culturilor duble sau prin înțeparea mediului cu biomasă bacteriană la maximum 2 cm de o rondea calibrată (5 mm) de miceliu. Culturile de ciuperci fitopatogene au fost împropățate pe mediu CGA (cartof, dextroză, agar) și incubate la 28°C, timp de 5 zile. Tulpina 56.1s a fost împropățată pe mediu Luria-Bertani (LB), agarizat prin incubare la 28°C, timp de 24 h. Testarea activității antagoniste *in vitro* a fost efectuată pe mediul cu cartof glucoză agar (CGA). Plăcile Petri însămânțate cu microorganismele de testat au fost incubate la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) produsă de *Brevibacillus laterosporus* 56.1s, la 24, 48 și 72 h. Experiența a fost repetată de trei ori.

Tabelul 5

Testarea in vitro a activității antagoniste a tulpinii de Brevibacillus laterosporus 56.1s asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm)

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina 56.1s
<i>Fusarium graminearum</i>	5
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radialis lycopersici</i>	5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8
<i>Sclerotium bataticola</i>	2
<i>Alternaria</i> spp.	5

Rezultatele au demonstrat ca tulpina 56.1s produce metaboliți antifungici, care au inhibat dezvoltarea ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciuperca *Sclerotinia sclerotiorum* (8 mm), aceasta fiind urmată de *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* și *Alternaria* spp. (5 mm).

Tulpina 56.1s a fost analizată în ceea ce privește producerea de enzime, care au un rol important în colonizarea materialului vegetal, în activitatea antagonistă și în modularea consorțiilor de consens, formate de diferite tipuri de microorganisme.

Producerea de amilază s-a analizat prin însămânțarea, sub forma de striu, pe mediul nutrient agar (NA) + 0,4% amidon solubil. Plăcile au fost incubate la 28°C, timp de 48...72 h, după care s-au tratat cu soluție de iod în iodură de potasiu, prin inundare. Zonele clare din jurul creșterii bacteriene, după adăugarea soluției de iod, au indicat descompunerea amidonului din mediu și, deci, producerea de amilază. Rezultatele au reflectat faptul că tulpina 56.1s produce amilază.

Producerea de lactonază (enzima implicată în quorum quencing, prin care se împiedică comunicarea dintre bacteriile dăunătoare care folosesc sistemul de quorum sensing de tip AHL) s-a analizat prin inocularea tulpinii 56.1s în 2 ml mediu lichid Luria Bertani, în care s-a adăugat C6-hexanoil homoserin lactonă (C6-HHL), în concentrație finală de 5 μM, urmată de incubarea peste noapte la 28°C și 150 rpm. Simultan, același mediu numai cu C6-HHL a fost utilizat ca martor negativ, pentru a vedea dacă mediul induce lactoliza. Testul a fost efectuat, pe plăci Petri, cu mediul LBA (Luria Bertani cu agar) suplimentat cu 50 μg/ml kanamicină și inoculat în plaja cu tulpina biosenzor de *Chromobacterium violaceum* CV026, prin distribuția, sub formă de plajă, a unei cantități de 250 μl dintr-o cultură de 12 h. Pe suprafața plăcii astfel inoculate, au fost efectuate godeuri cu diametrul de 5 mm, în care s-au distribuit 100 μl din supernatantul culturii 56.1s. Vasele Petri au fost incubate peste noapte la 28°C și apoi analizate, pentru prezența halourilor violete. Absența halourilor violete a indicat faptul ca tot C6-HHL din mediul de creștere a fost degradat. Rezultatele au evidențiat faptul că tulpina 56.1s a produs lactonază.

Tulpina 56.1s a fost testată în ceea ce privește mobilitatea de migrare la suprafața agarului (swimming) și de agregare (swarming). Ca martor, a fost utilizată o tulpină martor, modificată genetic pentru a fi imobilă, *P. putida* PCL1760 (Validov, 2007). Pentru aceasta, tulpinile au fost împrăștiate pe mediul LB, suplimentat cu 1,8% agar și crescute peste noapte la 28°C. Vasele Petri cu 25 ml mediu LB. suplimentat cu 0,3% agar, pentru swimming. și cu 0,5% agar. pentru swarming. au fost preparate și lăsate să se usuce, pentru 20...30 min, în hota cu flux laminar, înainte de utilizare. Tulpinile s-au inoculat prin înțepare, în centrul mediului, cu betișoare sterile din lemn. După 18 h incubare la 28°C, plăcile s-au analizat în ceea ce privește mobilitatea. Rezultatele au evidențiat faptul că tulpina 56.1s a prezentat ambele tipuri de mobilitate.

Tulpina 56.1s a fost testată *in vitro* în ceea ce privește formarea biofilmului prin cultivarea în mediul CM (Fall et al., 2004) și mediul M63 (OToole et al., 1998). Împreună cu tulpina 56.1s, au fost testate și două tulpini martor, *Pseudomonas fluorescens* WCS 365 (Simons et al. 1996) considerată martor pozitiv și *Bacillus subtilis* B168 (Burkholder et al., 1947) cunoscută ca fiind slabă producătoare de biofilm.

Testul a constatat în împrăștierea celulelor pe mediul LB, prin incubare la 28°C, timp de 18 h, după care 10 μl au fost utilizați pentru inocularea a 0,5 ml mediu CM și, respectiv, M63, distribuit în tuburi Eppendorf din polipropilenă. Tuburile astfel inoculate au fost incubate peste noapte la 37°C, fără agitare. În scopul analizei fenotipice a biofilmului, după eliminarea mediului din tuburi și clătirea cu apă distilată sterilă, celulele aderente au fost colorate cu 1% w/v cristal violet, timp de 10...15 min.

Formarea biofilmului a fost cuantificată prin adăugarea a 2x 200 μ l etanol 95% și spălarea celulelor aderente, colorate cu cristal violet. Etanolul a fost apoi transferat într-un tub Eppendorf de 1,5 ml și s-a ajustat volumul la 1 ml, cu apă distilată sterilă. Absorbanta s-a analizat la 540 nm, cu ajutorul spectrofotometrului.

Rezultatele, prezentate în tabelul 6, reflectă faptul că tulpina 56.1s a format biofilm pe cele două tipuri de medii testate. Pe ambele medii de creștere, analiza cantitativă a biofilmului a evidențiat diferența nesemnificativă dintre tulpina WCS365 și tulpina 56.1s. Pe mediul de creștere CM, s-a observat o mai bună dezvoltare a biofilmului, pentru toate tulpinile studiate, comparativ cu mediul M63.

Tabelul 6

Cuantificarea biofilmului, după 24 h de creștere în condiții statice la 37 °C, a tulpinii 56.1s, pe mediile CM și M63

Cod tulpină	Absorbanta 540 nm - Creștere pe mediul CM	Absorbanta 540 nm - Creștere pe mediul M63
56.1s	0,545	0,152
WCS365	0,612	0,206
B168	0,336	0,096

Formarea biofilmului este o caracteristică importantă a microorganismelor benefice, acest mecanism fiind direct implicat în protecția plantelor prin colonizarea substratului de creștere și competiția pentru nișă.

Tulpina 56.1s a fost analizată în ceea ce privește inocuitatea pe larve de *Galleria mellonella*, în conformitate cu protocolul descris de Seed et al. în 2008. Pentru aceasta, tulpina 56.1s de *Brevibacillus laterosporus* a fost cultivată pe mediul LB, la 28°C, cu agitare la 150 rpm, timp de 48 h, după care a fost centrifugată la 4000 rpm, iar sedimentul a fost resuspendat în 10 mM MgSO₄ suplimentat cu 1,2 mg/ml ampicilină. Concentrația inocului utilizat pentru tratarea larvelor a fost măsurată cu spectrofotometrul la OD 600 (cunoscându-se că OD600=1 reprezintă 10⁸ ufc/ml) și este indicată în tabelul 7.

Tabelul 7

Valoarea densității optice, la OD 600 nm, a inoculului de 56.1s, utilizat în testul de inocuitate

Cod tulpină	Valoarea citirii la OD 600 nm						
	Inocul nediluat	10 ¹ ufc/mL ⁻¹	10 ² ufc/mL ⁻¹	10 ³ ufc/mL ⁻¹	10 ⁴ ufc/mL ⁻¹	10 ⁵ ufc/mL ⁻¹	10 ⁶ ufc/mL ⁻¹
<i>Brevibacillus laterosporus</i> 56.1s	1.900	0.252	0.100	0.070	0.020	0.010	0.001

Larvele de *G. mellonella* au fost crescute pe mediul Haydak la 30°C. Pentru testul de inocuitate, larvele în ultimul stadiu au fost ținute la 4°C, timp de 5 min, după care au fost injectate cu 5 μ l suspensie bacteriană, utilizând o seringă Hamilton. Fiecare varianta de diluție, a cuprins 30 larve, iar zece larve au fost utilizate pentru fiecare repetitivă. Varianta martor a constat în larve injectate cu 5 μ l 10 mM MgSO₄ și 1,2 mg/ml ampicilină, în scopul analizării efectelor fizice letale, determinate de injecții. Larvele inoculate au fost menținute apoi pe mediul Haydak la 30°C, în întuneric. La 24, 48 și 72 h după infecție, larvele au fost analizate, iar cele moarte au fost numărate. Larvele care nu au prezentat semne vitale la

atingerea cu vârful pipetei, au fost considerate moarte. Rezultatele au evidențiat faptul că tulpina de *Brevibacillus laterosporus* 56.1s, nici atunci când a fost aplicată nediluată, nu a determinat o mortalitate mai mare de 50%, iar la diluția de 10^3 ufc/mL⁻¹, nu s-a determinat mortalitatea larvelor de *G. mellonella* (tabelul 8). Deci, tulpina de *Brevibacillus laterosporus* 56.1s nu este patogenă pentru organisme neîntință, fapt demonstrat prin mortalitatea redusă a larvelor de *G. mellonella*, tratate.

Tabelul 8

Procentul larvelor de *Galleria mellonella* moarte la 24, 48 și 72 h după inoculare cu tulpina *Brevibacillus laterosporus* 56.1s

Varianta	% larve moarte		
	24 h	48 h	72 h
Martor	0	0	0
Inocul nediluat	30	40	40
10^1 ufc/mL ⁻¹	20	20	30
10^2 ufc/mL ⁻¹	10	30	30
10^3 ufc/mL ⁻¹	0	0	0

Pentru determinarea capacității de colonizare a materialului vegetal, s-au utilizat paie de grâu sterilizate prin iradiere gamma. Paie sterile, de circa 6...7 cm, au fost depuse aseptice pe plăci Petri cu diametrul de 9 cm, care conțineau hârtie de filtru umectată cu tampon fosfat salin steril. Pe un capăt al paiului de grâu, s-au depus 10 μ l suspensie bacteriană, conținând 10^6 ufc/ml 56.1s. După 48 h, s-a prelevat aseptice capătul celălalt al paiului (circa 2 cm), care s-a trecut într-o eprubetă cu 10 ml tampon fosfat salin steril. S-a fiert timp de 10 min, iar din izolatul răcit, s-au prelevat 0,5 ml, care s-au diluat serial de trei ori și s-au inoculat pe nutrient agar. Coloniile formate au fost reidentificate ca fiind *Brevibacillus laterosporus*, pe baza unui test de microetalarie fenotipică de tip Biolog și a testelor API 20E. Concluzia experimentului a fost că tulpina bacteriană 56.1s prezintă capacitate de colonizare a materialului vegetal.

Pentru a verifica activitatea de protecție a plantelor de porumb împotriva atacului de *Fusarium graminearum*, s-a realizat o experiență în condiții controlate. Semințele de porumb, sterilizate chimic prin spălări repetate cu hipoclorit, au fost bacterizate cu o suspensie bacteriană de 10^8 ufc/ml. S-a lucrat față de un martor neinoculat și cu un martor etalon, tratat cu un produs chimic (2 g/kg, metiltiofanat 70%). Infecția s-a realizat prin tratarea soluției nutritive cu o suspensie concentrată de spori, astfel încât numărul de spori per mililitru de soluție nutritivă a fost de 10^4 ufc/ml. Variantele experimentale au fost: V₁ - 56.1s; V₂ - 56.1s + *Fusarium graminearum*; V₃ - metil tiofanat 70% 2 g/kg + *Fusarium graminearum*; V₄ - Martor neinoculat cu bacterii sau ciuperci. Fiecare variantă a fost realizată în 5 repetiții. S-au utilizat pungă de creștere cyg (Mega International), iar în fiecare pungă, s-au plasat 3 semințe pregerminate. Pungile au fost amplasate randomizat într-o cameră de creștere. Plantulele au fost crescute în condiții controlate (temperatură de 22°C $\pm$ 0,2°C, iluminare 12 h pe zi, cu 250 μ mol fotoni m⁻²s⁻¹), timp de 10 zile. Rezultatele finale au arătat că tulpina 56.1s are o eficacitate de peste 90%, cu 2% mai mult decât etalonul chimic tiofanatmetil. Deci tulpina 56.1s prezintă un antagonism semnificativ pentru *Fusarium graminearum* și *in vivo*, în condiții controlate.

S-au prelevat aseptice părți din tulpinița plantulelor provenite din semințe pregerminate, tratate cu tulpina 56.1s. Tulpinițele s-au trecut într-o eprubetă cu 10 ml tampon fosfat salin steril. S-a fiert timp de 10 min, iar din izolatul răcit, s-au prelevat 0,5 ml, care s-au diluat

serial de trei ori și s-au inoculat pe nutrient agar. Coloniile formate au fost reidentificate ca fiind *Brevibacillus laterosporus*, pe baza unui test de microetalarie fenotipică de tip Biolog și a testelor API 20E. S-a concluzionat că tulpina 56.1s are capacitatea de a coloniza endofit plantele de porumb, pe care le protejează împotriva atacului unor patogeni majori.

A fost realizat și un experiment de testare, în condiții de câmp, a eficacității tulpinii 56.1s. Experimentele de cultivare au fost realizate pe un cernoziom cambie, la Amzacea (Dobrogea). Cultura de mază de toamnă, *Pisum sativus* subsp. arvense, cv. Enduro, a fost semănată direct în miriștea de grâu, la sfârșitul lunii septembrie. S-a folosit o mașină de semănat direct în miriște și s-a semănat la o densitate de 70...75 semințe germinabile de mază/m², corespunzând unei cantități de 65...75 kg/ha. Adâncimea de semănat a fost de 7...8 cm. În primăvară, s-a transformat cultura de mază în mulci bioactiv, prin tăvălugire și tratare cu 900 l de suspensie care include un erbicid total pe bază de glifosat, aplicat în doză de 1,25 s.a./ha, și suspensie de 10⁵ ufc/ml spori de *Brevibacillus laterosporus* 56.1s. S-a însămânțat o cultură de porumb hibrid mediu, la o densitate de 5...7 boabe germinabile/m², după 14 zile de la mulcire. Cultura de porumb a fost întreținută până la jumătatea lunii mai, când s-a aplicat o fertilizare cu 250 m³/ha, cu o doză de 60 îngrășăminte complexe, care conțin 15% azot, 5% fosfor, 20% potasiu și 2% microelemente. S-a întreținut în continuare cultura de porumb și s-a recoltat la sfârșitul lunii septembrie. S-a lucrat față de o variantă martor intensiv, la care s-a realizat o arătură de toamnă adâncă, tratarea cu erbicide preemergente și postemergente, fertilizarea în aceeași perioadă. De asemenea, s-a folosit și o variantă la care nu s-a realizat bioactivarea mulciului vegetal cu bacterii 56.1s. Fiecare variantă a fost realizată în 4 repetiții.

În stadiul V₆ al dezvoltării porumbului, s-a determinat vigoarea plantelor, înălțimea și biomasa aeriană. Vigoarea plantelor s-a diferențiat semnificativ în stadiul V₆. Pe o scară de la 1 la 9, la sistemul intensiv, vigoarea plantelor a fost de doar 7, în pofida condițiilor climatice foarte favorabile pentru porumb în anul de experimentare. La sistemul în care s-a folosit mulci vegetal, vigoarea a crescut la 7,5. La sistemul cu mulci bioactivat, tratament al mulciului cu suspensie de bacterii 56.1s, plantele de porumb au prezentat o vigoare sporită, de 8,5. Înălțimea plantelor nu a fost influențată semnificativ, la mulciul bioactivat, plantele au acumulat o semnificativ mai multă biomasă. În final, vigoarea suplimentară a plantelor de porumb protejate și în condiții de câmp de atacul ciupercilor fitopatogene din sol s-a concretizat într-un spor de producție de aproximativ 10%. Datele sunt prezentate în tabelul 9.

Tabelul 9

Influența diferitelor sisteme tehnologice asupra creșterii și producției porumbului¹

Varianta	Vigoarea ² medie a plantelor	Înălțimea plantei stadiul V ₆ (cm)	Biomasă aeriană uscată (g)	Producția kg/ha
Martor intensiv, arat	7	41,6a	1,85a	9220a
Mulci vegetal	7,5	38,3a	2,08a	8920a
Mulci vegetal bioactivat cu 56.1s	8,5	42,5a	2,47b	9870b

¹ - valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05;

² - stadiul V₆, vigoarea 1 - plante mici cu frunze mici; 9 - plante mari cu frunze robuste.

Creșterile de producție s-au realizat în condițiile unui sistem conservativ, în care sunt reduse costurile de producție aferente folosirii erbicidelor și arăturii, iar folosirea unei culturi de protecție este încurajată prin plățile compensatorii, asociate măsurilor de agromediu.

Tulpină 56.1s de *Brevibacillus laterosporus*, cu numărul de depozit DSM 23663, **caracterizată prin aceea că** este antagonistă față de ciupercile fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*, prezintă o capacitate ridicată de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor vegetale, datorită producerii de amilază și lactonază AHL, mobilității de migrare și agregare, și formării de biofilme, și asigură creșterea nivelului producțiilor de porumb în sistemele de agricultură conservativă pe bază de mulci bioactiv, în condițiile reducerii folosirii erbicidelor și arăturii.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 87/2015