



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

(71) Solicitant:
• **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.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

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

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

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină 56.1s de *Brevibacillus laterosporus*, număr depozit DSMZ 23663, destinată utilizării în exploatațiile agricole conservative, care este antagonistă față de ciupercile fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum f. sp. radicle-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*, și care prezintă o capacitate ridicată de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor vegetale, datorită producerii

de amilază și lactonază AHL, a mobilității de migrare și agregare, și a formării de biofilme, și asigură creșterea nivelului producțiilor de porumb în sistemele de agricultură conservativă pe bază de mulci bioactiv, în condițiile reducerii costurilor de producție aferente erbicidării și arăturii.

Revendicări: 1

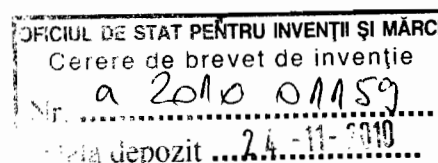
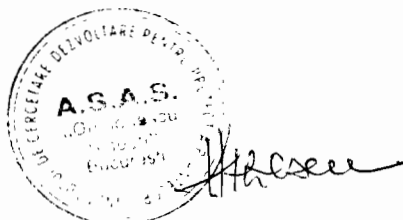
TULPINA DE *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS* ANTAGONISTA FAȚA DE CIUPERCI FITOPATOGENE

Prezenta invenție se referă la o tulpină nouă de *Brevibacillus laterosporus* (număr depozit DSM 23663), care prezintă, concomitent, antagonism față de ciupercile fitopatogene din sol și capacitate ridicată de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor plantelor, și care este destinată utilizării în exploatațile 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. Brevetul WO 2008/03887 descrie o tulpină de *Brevibacillus laterosporus*, UNISS18, nepatogenă pentru om, depozitată cu numărul 41419 la NCIMB, care este prezintă activitate insecticidă pentru dipterele care sunt vectori ai unor boli umane (*Musca domestica*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles maculipennis*, *Aedes aegypti*). Tulpina este destinată combaterii biologice a acestor diptere prin aplicare în diferite tipuri de formulări. Brevetul SUA 5055293 se referă la tulpina P5 de *Brevibacillus laterosporus* (nr 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.

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 agenți fitopatogeni din sol, ar proteja plantele de cultură pe care le colonizează și ar asigura un management durabil al resturilor vegetale.



Tulpina *Brevibacillus laterosporus* 56.1s (număr 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.

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;
- capacitate 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;
- acțiune împotriva atacului principalelor ciupercilor fitopatogene de sol;
- mobilitate ridicată, capacitate de a coloniza material vegetal și de a forma biofilme;
- capacitate de colonizare a țesuturilor plantelor în primele faze de vegetație și de protejare împotriva atacului unor agenți fitopatogeni.

Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos.

Exemplu. Tulpina 56.1s de *Brevibacillus laterosporus* a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, dintr-o proba de sol provenit din Bărăganul de sud. Pentru izolarea bacteriei s-a utilizat agar nutritiv (peptona – 5g/l, extract de carne – 3g/l, agar – 20g/l, la 1000 ml apa; pH 6.8-7.2), iar pentru cultivare s-a utilizat mediul Luria-Bertani agarizat (LBA: bacto-triptona – 10g/l, extract de drojdie – 5g/l, NaCl – 10g/l, agar – 20g/l, la 1000 ml apa; pH 7.5.), la o temperatura optima de incubare de 28°C.

Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 50 izolate de bacili sporulanți gram-pozitivi, pe baza acțiunii antagoniste față de ciupercile fitopatogene de sol (*Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. radialis-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*.

În vederea încadrării taxonomice, tulpina 56.1s a fost caracterizată pe baza unei taxonomii polifazice, respectiv a combinării caracterelor morfologice (tabel 1), cu cele fiziologice (tabel 2) și cu cele moleculare (secvența 16S rADN, tab.3, profilului de acizi grași din lipidele membranare, tab. 4). Coroborând toate aceste



date, tulpina 56.1s a fost încadrată ca aparținând speciei *Brevibacillus laterosporus*.

Tab. 1. Morfologia coloniilor de *Brevibacillus laterosporus* 56.1s pe diferite medii după cultivare timp de 24 ore.

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii Usa2		
		culoare	aspect exterior	dimensiuni (24h)
Medii gelificate semi-sintetice	mediul cu decoct de cartof - glucoza - agar (CGA)	brune	ruogoase, margini neregulate sub forma de filamente	colonii medii
	mediu cu extract de carne (beef extract)	crem	ruogoase, centrul proeminent, încrețit, margini neregulate	colonii mari
	mediul cu decoct de fasole	crem-brun	ruogoase, margini neregulate	colonii medii
	mediul cu extract de sol	crem-brun	ruogoase, margini neregulate	colonii medii
Medii solide naturale	feli de cartof sterile	brun	ruogoase, margini neregulate, centru cu rugozități fine	colonii mari
Medii lichide	mediul cu decoct de cartof - glucoza	-	peliculă fină la suprafața, ruogoasă, turbiditate slabă	-
	mediu cu extract de carne	-	peliculă fină la suprafața, ruogoasă, turbiditate slabă	-

Tab. 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	+
Creștere anaeroba	-
Sursa de carbon:	
malonat	+
citrat	+
propionat	-
tartrat	+
trehaloza	+
glucoza	+
Acidifica:	
xiloza	+
glucoza	+
arabinoza	±
manitol	+
rafinoza	+
celobioza	+
Toleranța la NaCl 7%	+



[Handwritten signature]

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; amplificare 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 tab. 3, ele dovedind o similaritate de 99,8% cu alte tulpini de *Brevibacillus laterosporus*.

Tab. 3. Identificarea tulpinii pe baza similarității secvenței 16 S rADN cu tulpinile din GenBank.

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN ¹	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinii ²
56.1s	840	GACGAACGCT GCGGGCGTGCCTAATACATG AAGTCGAGCGAGGGTCTTC GGACCCTAGCGCGGACGGGAGTAACACTAGGCAACCTGCCTG TNAGCTGGGATAACATAGGGAAACTATGCTAATACCGGATAGG GTTTTGCTTCTGAAGCGAAACGGAAA GATGGCGCAAGCTATCACTT ACAGATGGGC CTGCGGCGCA TAGCTAGTT GGTGAGGTAANGGCTCACCAAGGCGACGAT GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTCGG GAGGCACAGTAGGGAATTTCCACATGGACGAAATCTGATGGAG CAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCGGTCGTAAGTTCTGT TGTTGGGAAGAAAAGTGCTATTAATAAGGTAGCACCTTGA CGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCGCC GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT GTCCGGAATT ATTGGGCGTAAAGCGCGCGC AGGTGGCTAT GTAAGTCTGA TGTTAAAGCCCGAGGCTCAA CCTCGTTTCGATTGGAAAC TGTGTAGCTT GAGTGCAGGA GAGGAAAAGTG GATTCCACGTGTAGCGGTG AAATGCGTAG AGATGTGGAG GAACACAGT GGCGAAGGCG ACTTCTGGC CTGTAACGACTGAGGCG CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGTAACGATGAG TGCTAGGTGT TAGGGGTTTC AATACCCTTA GTGCCGCAGC TAACGCAATA	<i>Brevibacillus laterosporus</i> NBRC 15654 - similaritate: 99,8%

¹ - (perechi de baze - pb); ² - pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank (nr. 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, coloana capilara tip Ultra 2 (cod Agilent 19091B-102, având lungimea de 25m, diametrul interior de 0,2mm, faza staționara 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 profile de esteri metilici ai acizilor grași pentru microorganisme aerobe 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 lineară cu număr 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).

Tab. 4. Profilul acizilor grași din membrana tulpinii 56.1s.

Timp 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 radiceis-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 maxim 2 cm de o rondea calibrată (5 mm) de miceliu. Culturile de ciuperci fitopatogene au fost înprospătate pe mediu CGA (cartof, dextroza, agar) și incubate la 28°C timp de 5 zile. Tulpina 56.1s a fost înprospătată pe mediu Luria-Bertani (LB) agarizat prin incubare la 28°C timp de 24 ore. Testarea activității antagoniste *in vitro* a fost efectuată pe mediul cu cartof glucoza 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 *B. laterosporus* 56.1s, la 24, 48 și 72 ore. Experiența a fost repetată de trei ori.

Tab. 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).

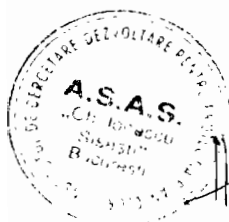
Ciuperca fitopatogena	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina 56.1s
<i>Fusarium graminearum</i>	5
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i>	5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8
<i>Sclerotium bataticola</i>	2
<i>Alternaria</i> spp.	5

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 *S. sclerotiorum* (8 mm) aceasta fiind urmată de *Fusarium graminearum*, *F. oxisporum* 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 ore, 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 ca tulpina 56.1s produce amilaza.

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



Prof. Dr. I. H. H. H. H.

24 -11- 2010

kanamicină și inoculat în plaja cu tulpina biosenzor de *Chromobacterium violaceum* CV026 prin distribuția sub formă de plaja unei cantități de 250 μl dintr-o cultură de 12 ore. 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. Petriurile au fost incubate peste noapte la 28°C și apoi analizate pentru prezența halourilor violete. Absența halourilor violete a indicat faptul că 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 tulpina martor, modificată genetic pentru a fi imobilă, *P. putida* PCL1760 (Validov, 2007). Pentru aceasta, tulpinile au fost înprospătate pe mediul LB suplimentat cu 1,8% agar și crescute peste noapte la 28°C. Petriuri 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 minute în hota cu flux laminar înainte de utilizare. Tulpinile s-au inoculat prin înțepare în centrul mediului cu betișoare sterile din lemn. După 18 ore 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 (O'Toole *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 înprospătarea celulelor pe mediul LB prin incubare la 28°C timp de 18 ore, 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 minute.

Formarea biofilmului, a fost cuantificată prin adăugarea a 2x 200 μl 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 in tabelul 6, reflecta faptul ca tulpina 56.1s a format biofilm pe cele doua tipuri de medii testate. Pe ambele medii de crestere, analiza cantitativa a biofilmului a evidentiat diferenta nesemnificativa dintre tulpina WCS365 si tulpina 56.1s. Pe mediul de crestere CM s-a observat o mai buna dezvoltare a biofilmului, pentru toate tulpinile studiate, comparative cu mediul M63.

Tab. 6. Cuantificarea biofilmului după 24 ore de creștere in condiții statice la 37°C a tulpinii 56.1s, pe mediile CM si M63.

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

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

Tulpina 56.1s a fost analizata in ceea ce privește inocuitatea pe larve de *Galleria mellonella* in conformitate cu protocolul descris de Seed *et al.* in 2008. Pentru aceasta, tulpina 56.1s de *Brevibacillus laterosporus* a fost cultivata pe mediul LB la 28°C cu agitare la 150 rpm timp de 48 ore, dupa care a fost centrifugata la 4000 rpm iar sedimentul a fost resuspendat in 10mM MgSO₄ suplimentat cu 1,2 mg/ml ampicilina. Concentrația inocului utilizat pentru tratarea larvelor a fost masurata cu spectrofotometrul la OD 600 (cunoscându-se ca OD600=1 reprezintă 10⁸ ufc/ml) si este indicata in tabelul 7.

Tab.7. Valoarea densității optice la OD600nm a inoculului de 56.1s utilizat in testul de inocuitate.

Cod tulpina	Valoarea citirii la OD 600nm						
	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>B. 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 in ultimul stadiu au fost tinute la 4°C timp de 5 minute, după care au fost injectate cu 5μl suspensie bacteriana, utilizand o seringă Hamilton. Fiecare varianta de dilutie a cuprins 30 larve, iar zece larve au

fost utilizate pentru fiecare repetitive. Varianta martor a constat in larve injectate cu 5µl 10mM MgSO₄ si 1,2 mg/ml ampicillin in 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 si 72 ore 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 10³ ufc/mL⁻¹ nu s-a determinat mortalitatea larvelor de *G. mellonella* (tabel 8). Deci tulpina de *Brevibacillus laterosporus* 56.1s nu este patogenă pentru organisme nețintă, fapt demonstrat prin mortalitatea redusă a larvelor de *G. mellonella* tratate.

Tab. 8. Procentul larvelor de *G. mellonella* moarte la 24, 48 si 72 ore după inoculare cu tulpina *B. laterosporus* 56.1s.

Varianta	% larve moarte		
	24 ore	48 ore	72 ore
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 µl suspensie bacteriană conținând 10⁶ ufc/ml 56.1s. După 48 ore s-a prelevat aseptice capătul celălalt al paiului (cca 2 cm), care s-au trecut într-o epubetă 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 re-identificate ca fiind *Brevibacillus laterosporus*, pe baza unui test de microetalare 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. Semintele de porumb sterilizate chimic prin spălări repetate cu hipoclorit au fost bacterizate cu o suspensie bacteriană de 10⁸ ufc/ml. S-a lucrat față de un martor

24 -11- 2010

neinoculat și cu un martor etalon, tratat cu un produs chimic (2g/kg, metiltiofanat 70%). Infecția s-a realizat prin tratatarea soluției nutritive cu o suspensie concentrată de spori, astfel încât numărul de spori per ml de soluție nutritivă a fost de 10^4 ufc/ml. Variantele experimentale au fost: V_1 - 56.1s; V_2 - 56.1s + *F. graminearum*; V_3 - metil tiofanat 70% 2 g/kg + *F. graminearum*; V_4 - Martor neinoculat cu bacterii sau ciuperci. Fiecare variantă a fost realizată în 5 repetiții. S-au utilizat pungii 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 $22^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$, iluminare 12 ore pe zi cu $250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 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 tiofanat-metil. Deci tulpina 56.1s prezintă un antagonism semnificativ pentru *F. graminearum* și *in vivo*, în condiții controlate.

S-au prelevat aseptice părți din tulpinița plantulelor provenite din semințe pre-germinate 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 re-identificate 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 cambic, la Amzacea (Dobrogea). Cultura de mazăre 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 mazăre/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 mazăre în mulci bioactiv prin tăvălugire, și tratare cu 900 litri de suspensie care include un erbicid total pe bază de glifosat, aplicat în doză de 1,25 s.a./ha, și suspensie de 10^5 ufc/ml spori *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 fertirigare 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 arătură de toamnă adâncă, tratarea cu erbicide pre-mergente și



post-emergente, 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 mulci 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 aprox.10%. Datele sunt prezentate în tab. 9.

Tab. 9. Influența diferitelor sisteme tehnologice asupra creșterii și producției porumbului¹.

Varianta	Vigoarea ² medie a plantelor	Înălțimea plantei stadiul V6 (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 agro-mediu.



TULPINA DE *BREVIBACILUS LATEROSPORUS* ANTAGONISTA FATA DE CIUPERCI FITOPATOGENE

Revendicare

1. Tulpina 56.1s de *Brevibacillus laterosporus*, număr depozit DSM 23663, DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germania, caracterizată prin aceea că este antagonistă față de ciuperci fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum 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 costurile de producție aferente folosirii erbicidelor și arăturii.

