



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01379**

(22) Data de depozit: **21.12.2010**

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

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU 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;**

• **SICUIA OANA, 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;**
• **ZAMFIROPOL ROXANA, STR.NADEȘ
NR.42 A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CONSTANTINESCU FLORICA,
STR. EMANOIL PORUMBARU NR. 67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **TULPINĂ DE BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS SUBSP.
PLANTARUM CU ACȚIUNI BENEFICE DIVERSE ASUPRA
PLANTELOR DE CULTURĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Bacillus Amyloliquefaciens subsp. Plantarum B100*, cu număr de depozit NCAIM (P) B001362, destinat utilizării ca bio-inoculant în culturile agricole, inclusiv pentru fortifierea recoltei de cereale boabe în zonele cu deficit de seleniu. Tulpina *B. Amyloliquefaciens B100* produce antibiotice lipopeptidice și policetidice, și enzime hidrolitice, protează și lactonază, prezentând un spectru larg de acțiune antifungică față de ciupercile de sol fitopatogene și față de bacteriile care afectează pomii la înflorit,

și are activitate de stimulare a creșterii plantelor, datorită producerii endofite de factori de creștere și capacității de mineralizare a materialului vegetal, datorită producerii de amidon, fitază și celulază. Tulpina B100 solubilizează fosforul anorganic, biodisponibilizează seleniul și stimulează preluarea și acumularea de seleniul de către plantele de grâu și porumb.

Revendicări: 1



w

TULPINĂ DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* CU ACȚIUNI BENEFICE DIVERSE ASUPRA PLANTELOR DE CULTURĂ

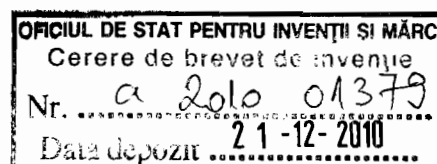
Prezenta invenție se referă la o nouă tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B100, depozitată NCAIM B001362, destinată utilizării ca bioinoculant în culturile agricole, inclusiv pentru biofortifierea recoltei de cereale-boabe în zonele cu deficit de seleniu.

Sunt cunoscute mai multe tulpini de *Bacillus amyloliquefaciens* destinate utilizării ca bioinoculant agricol. Brevetul US 6960342 descrie tulpina B190 (depozitată sub numărul CCRC 910182 la FIRDI, Hsin-Ciu, Taiwan) utilizată pentru protecția crinului taivanez (*Tricyrtis formosana*) împotriva putregaiului cenușiu (*Botrytis elliptica*). Brevetul US 7615366 prezintă tulpina KTGB0202 de *B. amyloliquefaciens* (număr de depozit KCTC 10564BP, KCTC, Taejon, Republica Coreea) care este activă față de o gamă largă de fitopatogeni. Cererea de brevet KR20060021162 protejează tulpina MJ-3 de *B. amyloliquefaciens*, care este concomitent antagonistă pentru fitopatogeni și cu o activitate de favorizare a creșterii vegetale.

Până în prezent nu au fost descrise tulpini de *B. amyloliquefaciens* care să prezinte antagonism pentru fitopatogeni, capacitate de stimulare a creșterii plantelor de cultură, activitate de solubilizare a fosforului, de mineralizare a materiei organice și de biodisponibilizare a seleniului, deși aceste bacterii sunt cunoscute pentru capacitatea lor ridicată de a produce exoenzime, inclusiv exohidrolaze active în degradarea materialului lignocelulozic. Brevetul SUA 7452445 se referă la utilizarea tulpinii PMBP-m7 de *B. amyloliquefaciens* (depozitată cu numărul PTA-5819 la ATCC, Manassas, SUA), împreună cu alte tulpini de *Bacillus*, pentru descompunerea materialului vegetal și formarea unei material celulozic fibrilar. Deși materialul rezultat este apoi utilizat în agricultură (prin formare de mulci organic), brevetul SUA 7.452.445 nu descrie caracteristici de antagonism pentru fitopatogeni și/sau de stimulare a creșterii plantelor pentru tulpina PMBP-m7.

Tulpina *B. amyloliquefaciens* B100 (număr de depozit NCAIM B001364, NCAIM, Budapesta, Ungaria) prezintă un spectru larg de acțiune antifungică față de ciupercile de sol fitopatogene, o capacitate semnificativă de stimulare a creșterii plantelor, o activitate mărită de: producere a unor exohidrolaze implicate în mineralizarea materialului vegetal, solubilizare a fosforului din formele sale organice și anorganice și de biodisponibilizare a seleniului.

Tulpina *B. amyloliquefaciens* B100 prezintă următoarele avantaje:



- creștere bogată pe mediile uzuale utilizate pentru creșterea bacililor gram pozitivi sporulați;
- antagonism pentru o serie de ciuperci fitopatogene de sol ceea ce permite folosirea ca bioinoculant pentru protecția primelor stadii ale plantelor de cultură față de acești agenți fitopatogeni de sol;
- antagonism pentru bacteriile care produc boli în timpul înfloritului (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas ice*⁺);
- stimularea creșterii plantelor datorită producerii *in situ* de fitohormoni și compuși volatili;
- capacitate de a intensifica mineralizarea materialului vegetal;
- complementaritate cu tehnologiile agricole conservative, în care, datorită faptului că sunt reduse lucrările solului și se menține peste 30% din teren acoperit cu resturi vegetale, semințele plantelor de cultură germinează mai greu și este creat un cadru favorabil atacului agenților fitopatogeni;
- îmbunătățirea nutriției plantelor prin solubilizarea fosforului insolubil anorganic prin producere de acizi organici, solubilizarea fosforului insolubil organic (săruri ale acidului fitic) prin producere de fitaze, biodisponibilizarea seleniului și stimularea preluării și acumulării lui de către plantele de grâu și porumb.

Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos

Exemplu. Tulpina B100 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, de pe ramuri de *Cydonia vulgaris*. Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 150 izolate de bacili sporulanți gram-pozitivi, pe baza: acțiunii de protecție a diferitelor plante de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol (*Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Pythium debaryanum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum f. sp. radicylucopersici*, *Sclerotium bataticola*), producerii *in situ* de factori de creștere pentru plante, capacității de degradare controlată a materialului vegetal cu formare de poliamine, compuși care cresc rezistența plantelor la stress-urile biotice și abiotice, solubilizării fosforului din formele sale solubile anorganice și organice, biodisponibilizării seleniului pentru plantele de grâu și porumb.

În vederea încadrării taxonomice tulpina B100 a fost caracterizată din punct de vedere morfologic (tabel 1), biochimic - fiziologic (tabel 2) și pe baza secvenței 16S rADN (tab.3).



Tab. 1. Morfologia coloniilor de *Bacillus amyloliquefaciens* B100 pe diferite medii după cultivare timp de 24 ore.

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii B100		
		culoare	aspect exterior	dimensiuni (24h)
Medii gelificate semi-sintetice	mediul cu decoct de cartof - glucoza - agar (CGA)	brune	rugoase, margini neregulate sub forma de filamente	colonii mari
	mediu cu extract de carne (beef extract)	crem	rugoase, centrul proeminent, încrêtit, margini neregulate	colonii mari
	mediul cu decoct de fasole	crem-brun	rugoase, margini neregulate	colonii medii
	mediul cu extract de sol	crem-brun	rugoase, margini neregulate	colonii medii
Medii solide naturale	felii de cartof sterile	brun	rugoase, margini neregulate, centru cu rugozități fine	colonii mari
Medii lichide	mediul cu decoct de cartof - glucoza	-	peliculă fină la suprafața, rugoasă, turbiditate slabă	-
	mediu cu extract de carne	-	peliculă fină la suprafața, rugoasă, turbiditate slabă	-

Tab. 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii B100.

Testul biochimic	B100
Reactia Gram	+
Reactia Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Reducerea NO ₃ →NO ₂	+
Crestere anaeroba	-
Catalaza	+
Sursa de carbon:	
malonat	+
citrat	+
propionat	-
tartrat	+
trehaloza	+
glucoza	+
Acidifica:	
xiloza	+
glucoza	+
arabinoza	±
manitol	+
rafinoza	+
celobioza	+
Toleranta la NaCl 7%	+



21-12-2010

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; sequencing Reaction – PCR înainte de secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-ului ribozomal. 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 99,4% cu alte tulpini de *B. amyloliquefaciens*.

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

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN (perechi de baze - pb)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinii pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank (nr. de referință); - procentul de similaritate
B100	543	TGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAG ATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTC TGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGT TGGTGAGGTAACGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAG CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCT CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGG CGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (CP000560.1) - similaritate: 100%

Coroborând toate datele obținute, tulpina B100 a fost încadrată ca aparținând subspeciei plantarum de *B. amyloliquefaciens*, recent descrisă de Borriss et. al., 2010, doi:10.1099/ijls.0.023267-0 (subspeciei căreia îi aparține și tulpina FZB42, descrisă ca tulpină tip, cu care B100 are similaritate de 100% la secvență de nucleotide pentru 16S rADN).

Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii B100 a fost efectuată pe mediul cu cartof dextroza agar (CGA). Tulpina B100 (dintr-o cultura de 24 ore) a



21-12-2010

fost însămânțată pe mediu prin strierea cu ansa a unei linii drepte o distanță de 3 cm de o rondea calibrată de miceliu (5mm) din cele șapte ciuperci studiate. Plăcile Petri astfel însămânțate au fost incubate la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 24, 48 și 72 ore. Experiența a fost repetată de trei ori. Rezultatele (tab.4) au demonstrat că tulpina B100 produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciupercile toxigene *Aspergillus flavus* (8,5 mm) și *Fusarium graminearum* (9,5 mm). Acțiunea biologică este semnificativă și față de *Gaeumannomyces graminis*, *R. solani* și *F. oxisporum* f. sp. *radicis lycopersici* (8 mm), *S. sclerotiorum*, *V. dahliae* (7,5 mm), *P. ultimum* (7 mm), *S. bataticola* (6 mm).

Tab. 4. Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Bacillus subtilis* B100 asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm).

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina B100
<i>Rhizoctonia solani</i>	8
<i>Pythium ultimum</i>	7
<i>Fusarium graminearum</i>	9,5
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	8
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	7
<i>Sclerotium bataticola</i>	6
<i>Aspergillus flavus</i>	8,5
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	8
<i>Verticillium dahliae</i>	7,5

Pentru analiza produșilor secundari de metabolism din categoria policetidelor și a lipopeptidelor s-au extras probe din supernatantul culturilor de B100 pe mediu Landy (Glucoză 20 g; MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g; KCl 0,5 g; acid glutamic 5 g; MnSO₄ · H₂O 5 mg; Fe(SO₄) soluție 1% 0,1 ml; CuSO₄ · 5H₂O soluție 1% 0,02ml, apă până la 1000 ml). Bacteriile au fost crescute 12 și 72 ore la 37°C. Probele au fost extrase pe un cartuș de Chromafix C18ec (Machery-Nagel, Duren, Germania). După legare și spălare cu apă MilliQ (de 5 ori volumul patului cromatografic din cartuș), metaboliții au fost eluați cu metanol (de 2 ori volumul patului cromatografic din cartuș), uscați sub vacuum și resuspendați în 100 μl de metanol. Probele normalizate au fost analizate prin cromatografie de înaltă presiune în fază inversă, folosind o coloană Zorbax C18, de 4,6 mm diametru și

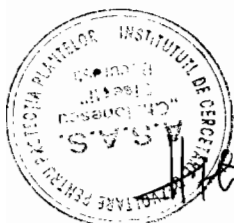


150 mm lungime, montată pe un sistem 1290 Infinity LC (Agilent, Palo Alto, SUA, cu detector cu lanț de diode – „diode array”) cuplat cu un spectrometru de masă Agilent 5230 Accurate TOF LC/MS. Lipopetidele au fost eluate în gradient, folosind soluții de 0,05% acid trifluoroacetic în acetonitril și în apă milliQ, cu un debit de 1 ml/min. Lungimea de undă pentru detecția eluatelor a fost stabilită la 280 nm, iar temperatura coloanei a fost menținută la 25 °C.

Policetidele au fost eluate într-un sistem de solvenți binar (solvent A: 0,1% formic acid în apă milliQ; solvent B: 0,1% acid formic în acetonitril) după cum urmează: 30% B pentru 5 min, urmat de 5 min gradient de la 30% B la 45% B și un gradient subsecvent de 25 min de la 45% B la 100% B. Debitul a fost de 0,5 ml/min la 40°C. Identitatea fiecărui metabolit a fost obținută pe baza masei moleculare a ionilor moleculari detectați prin spectrometrie de masă, folosind următoarele condiții de ionizare (atât în modul pozitiv cât și în cel negativ) temperatura sursei: 150°C; temperatura de desolvatare: 325°C; debit azot: 550 l/min; voltajul conului: 80 V. In supernatantul culturilor de 12 ore pe mediu Landy t au fost puse în evidență picuri care aparțin următoarelor clase de antibiotice policetide: macrolactină; bacilenă, clorotetaină (tab. 8). In cazul probelor provenite din culturii de 72 ore au fost detectate trei grupe picuri distincte de antibiotice lipopeptidice, care au fost identificate ca fiind din clasa surfactină, fengicină și iturină (tab. 5).

Tab. 5. Metaboliții produși de tulpina *Bacillus amyloliquefaciens* B100 cultivată pe mediu Landy.

Metabolit	Picul de masă observat	Identificare
Policetide		
Macrolactină	425.4 [M+Na] ⁺	Macrolactină A
	511.4 [M+Na] ⁺	7-o-malonil macrolactină A
	525.4 [M+Na] ⁺	7-o-succinil macrolactină A
	629.3 [M+H-H ₂ O] ⁺	Macrolactină D
Bacilenă	583.5 [M+H] ⁺	Bacilenă A
	605.5 [M+Na] ⁺	Bacilenă B
Clorotetaină	289.2 [M+H] ⁺	Clorotetaină (³⁵ Cl)
	291.1 [M+H] ⁺	Clorotetaină (³⁷ Cl)
Lipopeptide		
Surfactină	1044.8, 1060.8 [M+Na, K] ⁺	C14-surfactină
	1058.8, 1074.8 [M+Na, K] ⁺	C15-surfactină
Fengicină	1471.9, 1487.9 [M+Na, K] ⁺	Ala-6 C15-fengicină
	1485.9, 1501.9 [M+Na, K] ⁺	Ala-6 C16-fengicină
	1499.9, 1515.9 [M+Na, K] ⁺	Ala-6 C17-fengicină
	1513.9, 1529.9 [M+Na, K] ⁺	Val-6 C16-fengicină
	1527.8, 1543.8 [M+Na, K] ⁺	Val-6 C17-fengycină
Iturină A	1066.1 [M+Na] ⁺	C14-iturină A
	1079.7 [M+Na] ⁺	C15-iturină A



21-12-2010

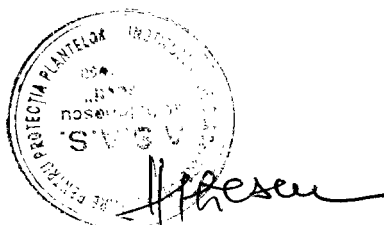
Antibioticele produse de tulpina B100 își exercită acțiunea de protecție împotriva patogenilor plantelor de cultură atât pe cale directă, prin inhibarea dezvoltării fitopatogenilor, cât și indirect, prin activarea sistemului de apărare din plante (Ongena *et al.*, 2007, Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants, *Environ. Microb.*, 9, 1084-1090).

În cadrul unui alt experiment a fost testată activitatea biosurfactantă a tulpinii *B. amyloliquefaciens* B100. Biosurfactanții produși de către antagoniștii din genul *Bacillus* sunt cei printre cei mai cunoscuți pentru proprietățile antagoniste, dar aceștia joacă un rol important și în mobilitatea bacteriilor. Activitatea biosurfactantă a tulpinii B100 a fost testată în supernatantul liber de celule bacteriene nediluat, diluat de 5x și de 10x. Pentru aceasta, tulpina a fost inoculată în 10 ml mediu Luria Bertani (LB) și în mediul optimizat Jacques; mediile inoculate au fost incubate 18 ore la 150 rpm și 37°C. Supernatantul din cele două medii de creștere a fost colectat și s-au făcut diluții. Tensiunea superficială a fost măsurată cu un inel Du Nouy (K6 Kruss, GmbH, Hamburg, Germania) (Kuiper *et al.*, 2004).

În ambele medii de creștere s-au înregistrat curbe similare ale tensiunii superficiale, dar în mediul optimizat tulpina a menținut o tensiune mai mare la diluții mai mari comparativ cu mediul LB; acest fapt demonstrează și pe această cale producerea de antibiotice de către tulpina B100, care-și exprimă la un nivel superior genele pentru sinteza antibioticelor lipopetidice biosurfactante în mediul optimizat Jacques.

S-a demonstrat că bacteriile B100 prezintă antagonism *in vitro* și *in situ* și față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas ice*⁺). Testul *in vitro* s-a efectuat pe mediu LB agarizat. Tulpinile fitopatogene folosite au fost *E. amylovora* NCAIM B 01108 și *Pseudomonas syringae* ATCC 53543. Tulpinile, înmăpătate cu 24 ore înainte de efectuarea testului, au fost însămânțate simultan în placi petri cu mediu LB agarizat, tulpinile fitopatogene fiind striate pe mijlocul plăcii, iar tulpina B100 de *B. amyloliquefaciens* perpendicular, la o distanță de 2 mm. Plăcile au fost incubate la 28°C timp de 24-48 ore. Testul a fost repetat de cinci ori. Rezultatul pozitiv s-a apreciat prin apariția zonelor de inhibiție. Tulpina Pss 33 a inhibat *in vitro* creșterea fitopatogenilor care afectează pomii fructiferi la înflorit (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae ice*⁺).

Testul *in situ* s-a realizat prin determinare interacțiilor microbiene pe flori detașate. Modelul experimental utilizat a fost cel al florilor izolate (Pusey, 1997). Ramuri de măr cu muguri au fost tăiate din copaci cu 4-5 zile înainte de înfloritului



și depuse la 4°C, cu baza imersată în apă. La startul experimentelor ramurile au fost scoase de la frigider și menținute la temperatura camerei (20 ... 23°C). Mugurii floralii s-au deschis în două zile. Conform protocolului florile deschise (petale și antele roșii) au fost prelevate cu pedunculul intact (1,5 cm lungime) și plasate în tuburi de microcentrifugă, cu capătul bazal al pedunculului scufundat într-o soluție sterilă de 20% zaharoză. Peste florile astfel pregătite au fost pulverizate suspensii 10^6 ufc/ml din tulpinile antagoniste testate. Suspensiile au fost preparate în tampon fosfat 10 mM cu 0,03% Tween 20. Tuburile Eppendorf au fost depuse în rack-uri, iar rack-urile cu flori inoculate au fost transferate în cutii de plastic de 10 l, pe al cărui fund era depozitată o soluție de glicerină 40% (pentru menținerea unei umidități de 93 ... 94%). Concomitent cu tratamentul cu bacterii antagoniste (în funcție de varianta testată) peste florile detașate s-a adăugat o suspensie 10^6 ufc bacterii fitopatogene (*Erwinia amylovora* NCAIM B 01108 și *Pseudomonas syringae* ATCC 53543). S-a incubat la 20°C (*Erwinia amylovora*) sau la 0°C (bacteriile care nuclează gheața). După 24 ore s-au făcut notări de eficacitate, conform unei scări de eficacitate cu note de la 0 la 5, conform următoarei scări: 0 - distrugere totală a florilor; 1 - 80... 90% din flori distruse; 2 - 60 ... 80% din flori distruse; 2 - 40 .. 60% din flori distruse; 3 - 20 ... 40% din flori distruse; 5 - 0 ... 20% din flori distruse. Tulpina B100 a protejat florile de distrugere, sub 20% din flori fiind distruse în varianta în care a fost aplicată, deci prezintă antagonism față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit/

Tulpina B100 a fost testată în condiții controlate în ceea ce privește eficacitatea în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, care atacă frecvent în stadiul de plantulă grâul și produc pagube.

Pentru efectuarea testului s-au utilizat cariopse de grâu (*Triticum aestivum*), cv. Alex. Semintele dezinfectate în prealabil cu soluție 4% hipoclorit, au fost imersate într-un amestec constând din suspensie celulară bacteriană cu titrul de 1×10^9 ufc/ ml și 1% metilceluloză în tampon fosfat (w/v). Inoculul fungic (de *Fusarium graminearum* DSMZ 4527) s-a obținut în plăci Roux, pe mediul natural alcătuit din boabe de ovăz dublu sterilizate la 1 atm. timp de 20 minute, prin inocularea cu miceliu și incubarea la 27°C timp de 3-4 zile.

Substratul utilizat în sera a constat din 1/2 pământ de grădină + 1/4 mranită + 1/4 nisip. Acesta a fost sterilizat prin iradiere gamma (2,5 KGy) și apoi amestecat uniform cu inoculul fungic ($\sim 2 \times 10^6$ spori/ kg sol) și distribuit în tăvi din plastic (32/24 cm) cu 48 ore înainte de semănat. În substratul astfel pregătit au fost semănat boabe de grâu, inoculate sau nu cu bacterii După 15 și 20 zile



Resce

s-a determinat numărul de plante răsărite și uniform dezvoltate. Rezultatele sunt prezentate în tab. 6, comparative cu un martor netratat și cu un tratament chimic.

Tab. 6. Eficacitatea biopreparatului în prevenirea atacului de *Fusarium graminearum* la plantulele de grâu (cv. Alex)

Varianta	Tratament	% plante răsărite	
		15 zile	20 zile
Substrat sterilizat prin iradiere, netratat	-	95	96
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , netratat	-	25	22
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , Propamocarb-HCl	Stropire sol, 0,2% i.a., 12 ore înainte de semănat	88	84
Substrat sterilizat prin iradiere, inocul de <i>F. graminearum</i> , inoculate cu B100	Imersare cariopse 10 ⁹ ufc B100 / ml	94	87

Evidențierea producerii de lactonază s-a realizat printr-un experiment în trepte. Numeroase bacterii Gram-negative patogene utilizează acil-homoserin-lactona (AHL) pentru expresia sensibilității de grup (*quorum sensing*). O enzimă denumită AHL-lactonaza produsă de numeroase tulpini de *Bacillus* sp. este capabila să hidrolizeze inelul moleculei de homoserin-lactona interferând astfel cu sistemul de comunicare al acestor bacterii (*quorum quencing*). Tulpina biosenzor de *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997) a fost utilizată ca indicator. Testul propriu-zis a constat în inocularea tulpinii B100 în 2 ml mediu lichid Luria Bertani în care s-a adăugat C6-hexanoil-homoserin-lactonă (C6-HHL) în concentrație finală de 5 μM și incubarea peste noapte la 28°C cu agitare la 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 CV026 prin distribuția sub formă de plaja a 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 bacteriene de testat. Petriurile au fost incubate peste noapte la 28°C și, ulterior analizate pentru prezența/absența halourilor violete. Absența halourilor violete a indicat faptul că, tot C6-HHL din mediul de creștere a fost degradat.

Tulpina B100 prezintă capacitate foarte ridicată de producere de lactonază, modulând comunicarea la nivel de grup a altor bacterii. Poate fi deci



21-12-2010

folosită pentru combaterea bacteriilor fitopatogene care utilizează C6-HHL sau pentru realizarea de consorții microbiene de consens în care este necesară modularea *quorum sensing*.

Următoarea serie de experimente a urmărit punerea în evidență a acțiunii de favorizare a creșterii și dezvoltării vegetale datorate producerii de fitohormoni *in situ* de către microorganismul în discuție. S-a urmărit evidențierea activității fitohormonilor giberelici produși de bacteriile gram pozitive sporulate, utile plantelor de cultura, pentru a se verifica calitatea biologică de favorizant de creștere.

Evidențierea și estimarea activității fitohormonilor giberelinici s-a efectuat prin biotestul inducerii α -amilazei din endospermul de orz cuplat cu tehnica difuziei radiale în gel. Etapele procedurii utilizate au fost:

- inducerea biosintezei α -amilazei în endospermul boabelor de orz de către fitohormonii prezenți în extractele de testat;
- difuzia radială în gelul de agar-amidon a enzimelor sintetizate sub acțiunea fitohormonilor și hidroliza consecutivă a amidonului;
- evidențierea zonei de acțiune a enzimei prin colorarea substratului.

Reactivi folosiți în cadrul acestui test au fost:

Gel de agar - amidon. În 100 ml tampon substrat pH 6,9 diluat cu 100 ml apă s-au dizolvat la cald 2,5 g agar și 1 g de amidon; s-a fiert până a devenit limpede.

Soluție tampon substrat pH 6,9; 590 mg acetat de sodiu + 1,47 g veronal sodic + 1,4 g NaCl + 780 mg CaCl₂ s-au dizolvat în apă distilată și apoi s-au adăugat 62 ml HCl 0,1 N și s-a adus la un volum final de 250 ml cu apă distilată.

Soluție de dezvoltare: 45 ml iod 0,1 N cu 55 ml etanol absolut

Extract de biopreparat realizat prin osmoza inversă.

Endosperm de orz. Boabe de orz s-au curtat de palee și li s-a înlăturat prin tăiere partea care conține embrionul.

Modul de lucru a implicat următoarele etape:

- depunerea unui gel de agar - amidon în grosime de 2-3 mm pe suport reprezentat de folii de acetat de celuloză sau lamele microscopice;
- practicarea în gel a unor godeuri cu diametrul de 3 mm;
- depunerea în godeuri a endospermului de orz (jumătate de bob fără embrion) și a extractului de testat (mediu de cultură a microorganismului);
- incubarea 72 h la temperatura camerei în incinta umedă;
- colorarea cu soluție de dezvoltare a gelului;
- măsurarea zonei de difuzie.

Fitohormonii giberelinici au fost extrași dintr-un mediu de cultură specific (LB) în care s-a incubat peste noapte o suspensie de 10⁶ ufc/ml bacterii. Extracția



s-a realizat prin dializă inversă a amestecului incubat peste noapte. Suspensia bacteriană a fost trecută într-un sac de dializă, care a fost suspendat timp de 24 ore în acetat de etil (dializă inversă). Biotestul s-a lucrat față de martori de reactivi, rezultat din extracția, prin dializă inversă, a mediului LB. Tulpina B100 a produs în condițiile date peste 28 μg echivalenți acid giberelic per ml, la peste 2/3 din nivelul produs de o tulpină etalon de *Azospirillum brasiliense* Sp001, recunoscută pentru capacitatea ridicată de producere de fitohormoni giberelici.

În alte experimente s-a realizat testarea mobilității tulpinii B165. Mobilitatea joacă un rol major în colonizarea rădăcinilor plantelor și este factorul direct implicat în mecanismul de combatere biologică prin competiție pentru nutrienți și spațiu. *Bacillus subtilis* B165 a fost testat pentru mobilitatea de migrare la suprafața agarului (*swimming*) și de agregare ca urmare a chemotaxiei (*swarming*), împreună cu o tulpină martor cunoscută ca fiind nemobilă, *P. putida* PCL1760.

Testul a constat în utilizarea unor culturi proaspete care au fost inoculate prin înțepare în centru plăcilor Petri cu mediu LB suplimentat cu agar în procent de 0,3% (pentru *swimming*) și 0,5% (pentru *swarming*). Tulpina B165 a demonstrat că posedă ambele tipuri de mobilitate, acest rezultat confirmând și producerea de către această tulpină de protează și surfactină.

Printr-o altă serie de experimente s-a urmărit biotestarea efectului stimulator al tulpinii B100 împreună cu alte tulpini asupra creșterii unor plante de floarea-soarelui și a avut în total 12 variante în 4 repetiții fiecare. Fiecare repetiție a avut 5 plante, iar fiecare variantă a avut 20 de plante. Tulpinile bacteriene au fost cultivate pe mediu LB lichid la 28°C, aerat și agitat prin amestecare la 150 rpm timp de 16 ore. Semințele de floarea-soarelui (cv. Favorit) au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfecție a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 de secunde cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă. Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4%, timp de 15 minute. Ulterior au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 în 25 de minute timp de două ore. Semințele au fost inoculate prin imersie în 3 ml suspensie bacteriană în concentrație de 10^7 ufc/ml în tampon fosfat și 2% carboxi-metil-celuloză, apoi au fost semăntate în pungi sterile de creștere "Cyg" (Mega International). Plantele 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 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). După semănt și pe toată durata experimentului, pungile au fost umectate cu soluție nutritivă Hoagland 0,25%. Creșterea rădăcinuțelor plantelor de floarea-soarelui a fost analizată la 15 zile de la semănt (tab. 7).



Tab. 7. Lungimea totala (mm) a rădăcinilor plantelor de floarea soarelui (cv. Favorit) la 15 zile de la semănat.

Varianta	Lungimea totala a rădăcinii (mm)	
Martor neinoculat	184.29	b
WCS 365	219.05	a
B 49 b	187.5	b
FL 400	174.54	b
Ps 33	173.5	b
56. 1s	184.75	b
Hm s1	200.86	ab
Cn s2	214.38	a
Sp s2	181.93	b
Tm s2	187	b
B100	225.79	a
77.3	292.6	b

Tulpina B100 a prezentat cea mai mare capacitate de a stimula dezvoltarea plantulelor de floarea-soarelui, asigurată statistic față de martorul neinoculat. Activitatea de stimulare a creșterii plantelor a tulpinii B100 a fost testată și față de grâu, *Triticum aestivum*, cv. Alex. În vederea inoculării, cariopsele de grâu au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfecție a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 de secunde cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă. Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4 %, timp de 15 minute. Ulterior, au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 în 25 de minute, timp de două ore. Cariopsele astfel dezinfectate au fost păstrate la 4°C, la întuneric, pe hârtie de filtru umectată. Tulpina B100 a fost cultivată pe mediu LB lichid la 28°C și 150 rpm timp de 16 ore. Inocularea semințelor s-a realizat la două concentrații, de 10⁶ sau 10⁸ ufc/ml. Bacterizarea cariopselor a fost efectuată prin imersare în suspensie bacteriană timp de 15 minute, la temperatura camerei, și agitare la 20 rpm. Ca martor, au fost folosite cariopse de grâu, sterilizate ca mai sus și imersate în apă distilată sterilă.

Cariopsele de grâu inoculate conform metodei descrise mai sus au fost puse la germinat în plăci Petri (cu diametrul de 9,4 cm), pe apă agarizată 0,8%, în număr de 20 de cariopse/placă, în 5 repetiții. Fiecare variantă a constat în 100 cariopse. Temperatura de incubare a fost de 28°C. S-au făcut observații în ceea ce privește numărul semințelor germinate la 24, 48 și 72 de ore.

Pentru determinarea influenței bacteriilor B100 asupra dezvoltării plantulelor de grâu, cariopsele de grâu inoculate cu suspensie bacteriană în concentrație de 10⁶ sau 10⁸ ufc/ml au fost distribuite în vase Petri (cu apă agarizată, diametrul plăcilor de 9,4 cm), câte 10 semințe/placă, în 3 repetiții (30 cariopse per variantă). Peste apa agarizată au fost adăugați câte 5 ml de mediu



mediu mineral nutritiv pentru plante cu formula: 0,4 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 2,4 g KNO_3 ; 1,6 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,8 g MgSO_4 , agarizat cu 2 g la litru. Plăcile au fost incubate la întuneric, la 28°C. S-au efectuat observații în ceea ce privește efectul de stimulare al creșterii rădăcinuțelor și a plantulelor de grâu după 72 de ore, determinându-se lungimea rădăcinuței și înălțimea plantulei.

Determinările referitoare la influența tulpinii asupra germinării și dezvoltării plantulelor au fost realizate comparativ față de un martor reprezentat de apă distilată sterilă, și față tulpini de bacili cu activitate fitostimulatorie dovedită. Rezultatele, prezentate în tab. 8 și 9, susțin existența unui efect fitostimulator exercitat de bacteriile B100 asupra plantulelor de grâu, și în special asupra sistemului radicular.

Tab. 8. Influența inoculului bacterian asupra capacității de germinare a cariopselor de grâu. (cv. Alex).

Tulpină bacteriană	Încadrare taxonomică	Concentrație inocul (ufc/ml)	% de cariopse germinate după		
			24 h	48 h	72 h
Mt	apă distilată sterilă	-	75	88	92
B49b	<i>Bacillus subtilis</i>	10^6	79	89	98
FL 400	<i>Paenibacillus graminis</i>	10^6	71	88	88
B100	<i>Bacillus amyliquefaciens</i> var. <i>plantarum</i>	10^6	88	82	99

Tab. 9. Testarea efectului de stimulare a creșterii plantelor de grâu (cv. Alex) de către tulpinile de bacterii testate (72 ore post-inoculare).

Tulpină bacteriană	Concentrație inocul (ufc/ml)	Germinație		Nr. răd.	Lungime răd. (cm)	Înălțime plantulă (cm)
		Din 30 sem.	%			
B49b	10^6	24	80	4	3,79	2,02
B49b	10^8	29	96,7	4	3,05	1,89
FL 400	10^8	26	86	3	3,93	2,27
B100	10^6	29	96,7	4	4,05	2,52
B100	10^8	30	100	4	4,27	2,62
Mt	-	25	83,3	4	3,68	2,54

DL 5% 0,36 0,29

A fost testată și capacitatea tulpinii B100 pentru producerea de enzime cu rol în mineralizarea materialului vegetal, determinându-se activitatea celulazică, cea proteazică și cea amilazică. Activitatea celulazică a fost determinată prin



însămânțarea pe mediu minimal, fără sursă de carbon, repartizat în placi petri, în care s-a adăugat 1% carboxi-metil-celuloză. Acestea au fost incubate la 28°C timp de 5 zile după care au fost colorate timp de 30 minute cu 0,3% roșu de Congo, urmata de clătire cu apă de robinet și fixarea colorantului prin incubare timp de 15 minute cu 10% acid acetic. Descompunerea substratului carboxi-metil-celuloză și, deci, producerea de celuloză a fost indicată de apariția unei zone clare în jurul creșterii bacteriene. Tulpina B100 produce celuloză, acesta fiind o caracteristică a subspeciei *plantarum* de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Producerea de amidază s-a pus în evidență prin însămânțarea sub forma de striu pe nutrient agar (NA) suplimentat cu 0,4% amidon solubil. Plăcile au fost incubate la 28°C timp de 48 -72 ore, apoi inundate cu soluție de iod în iodură de potasiu. Zonele clare din jurul creșterii bacteriene, după adăugarea soluției de iod au indicat descompunerea amidonului din mediu deci, producerea de amidază. Testele au indicat faptul că tulpina B100 produce amidază.

Producerea de proteaze s-a testat pe mediu minimal mineral, suplimentat cu cazeină 5%. S-au inoculat tulpinile de bacterii de test și plăcile au fost incubate la 28°C timp de 48 -72 ore. După incubare s-a tratat plăcile de agar au fost fixate cu o soluție de 50% metanol, 10% acid acetic glacial, 40% apă distilată, iar halo-urile din jurul coloniilor bacteriene au fost colorate cu o soluție de 60 mg/l Coomasie Blue R-250 în acid acetic 10%. Rezultatele au stabilit faptul că tulpina B100 este producătoare de proteaze.

Pentru că rezultatele au evidențiat faptul că tulpina B100 de *B. amyloliquefaciens* produce enzime implicate în degradarea materialului vegetal, a fost testată și pentru capacitatea de mineralizare a substratului organic (prin determinarea respirației, folosind ca substrat material vegetal și a eliberării de glucide și fosfor solubile din materialul vegetal).

Pentru evidențierea capacității de degradare a materialului vegetal, s-a realizat un experiment prin care s-a urmărit consumul de oxigen și eliberarea diferiților compuși din material vegetal tratat cu tulpini de microorganisme. Materialul vegetal (fân de mazărice păroasă în cazul bacteriilor sporulate gram pozitive) a fost măcinat în blender și trecut apoi pe sita de 0,250 mm. S-au ambalat câte 10 g de pulbere în pungi de polietilena, care s-au sterilizat prin iradiere gamma (la IRASM, IFIN, București). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g care s-au adus aseptice într-un Erlenmayer de 50 ml steril. Peste pulberea fin măcinată, s-au adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. Conținutul a fost omogenizat prin agitare și inoculat apoi cu 1 ml suspensie microbiană, normalizată la 10^8 ufc/ml. S-a menținut la agitator timp de 24 ore, la temperatura de 28°C, după care, s-a trecut aseptice într-un vas de respirație



Strathox (Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie). S-au efectuat determinările de respirație / producere de bioxid de carbon timp de 12 ore. După efectuarea determinărilor de respirație, s-a separat prin filtrare supernatantul, în care s-a determinat Carbonul Organic Total (TOC) cu un aparat Formacs HT (Skalar Analytical B.V., Breda Olanda), glucidele reducătoare (cu reactiv DNS) și fosforul solubil total (cu molibdat de amoniu și reactiv clorostanic).

Pentru determinarea capacității de mineralizare a substratului vegetal au fost testate 7 tulpini bacteriene: 56.1s; 77.3; 58.2, 77.1s și 82.1s din probe de sol provenite din Bărăganul de sud; B100 izolat din rizosferă de usturoi (Oltenia de Sud) și Mz.s1 izolat din sol cultivat cu mazăre (Dobrogea de sud) și 3 tulpini de *Trichoderma*: Td67 și Td85 izolate din Bărăganul de Sud și Tm, izolat din Oltenia de Sud. Probele au fost analizate comparativ cu doi martori respectiv, martor fără inocul bacterian și martor în care bacteria a fost cultivată în mediu uzual de creștere (Luria Bertani lichid).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 10. Aceste rezultate demonstrează existența unei activități ridicate de hidroliză a materialului vegetal de către majoritatea tulpinilor de microorganisme testate, inclusiv de către B100.

Tab. 10. Activitatea de degradare a materialului vegetal de către tulpinile de microorganisme testate*.

Tulpina	Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară)	Conținut de carbon organic total în supernatant (mcg/l)	Glucide solubile (mcg/l)	Fosfor solubil (mcg/l)
56.1s	0,12±0,03c	0,24±0,02c	1,67±0,06c	0,02±0,01c
77.3	1,56±0,32b	3,87± 1,17b	12,24±0,28b	17,87± 2,17b
58.2	1,51±0,05b	4,54±1,05b	12,64±0,41b	16,54±1,25b
77.1s	1,54±0,24b	4,54±1,25b	12,64±0,41b	18,42±1,54b
82.1s	1,85±0,18ab	5,87± 3,17ab	22,24±0,28ab	27,87± 4,17ab
B100	2,15±0,04a	7,24±2,52a	29,87±0,36a	35,24±3,52a
Mz.s1	1,62±0,12b	3,24±1,12b	11,87±0,63b	15,24±2,27b
Td67	1,58±0,28b	3,87± 1,72b	12,24±0,28	17,87± 3,23b
Td85	2,24±0,14a	7,54±1,25a	27,64±0,81a	36,44±4,07a
Tm	1,87±0,16ab	5,24±2,85ab	16,72±0,74b	15,42±2,23b

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05.

Martorul negativ conferă informații în timp real, referitoare la comportamentul unor probe ideale, fără activitate biologică de degradare a substratului vegetal, în condițiile de desfășurare a testului. În această variantă,

substratul vegetal nu a fost inoculat cu microorganisme și a fost menținut în condiții identice de incubare cu cele ale probelor test. Acesta oferă informații referitoare la cantitatea maximă de oxigen care ar putea fi regăsită în probe fără activitate de biodegradare. Martorul pozitiv oferă informații cu privire la capacitatea de dezvoltare a tulpinii analizate, în condițiile unei cultivări pe mediu uzual de creștere. Acest mediu permite multiplicarea microorganismului datorită unei hrăniri corespunzătoare și în condițiile de incubare oferite pe parcursul desfășurării testului.

Tulpina B100 prezintă o foarte ridicată capacitate de degradare a materialului vegetal, la nivelul ciupercilor din genul *Trichoderma*, ciuperci larg utilizate pentru accelerarea dezvoltării materialului vegetal.

A fost testată și capacitatea de producere de poliamine de către bacteriile selecționate. Mecanismul de acțiune prin care mulciul vegetal de leguminoase, și în special de mazărice păroasă își exercită acțiunea de stimulare a creșterii plantelor este cel de modulare a nivelului de poliamine din plante (compuși cu acțiune de reglare a proceselor metabolice din plante recunoscuți în ultimul deceniu). Modularea se realizează prin aportul de poliamine endogene și precursori, compuși formați datorită descompunerii materialului vegetal de leguminoase, cu un conținut ridicat de proteine. Bacteriile gram pozitive sporulate care sunt cele mai potrivite pentru formarea mulciului bioactiv sunt deci acele microorganisme care au capacitatea cea mai ridicată de a produce poliamine din materialul vegetal de mazărice păroasă. S-a lucrat cu pulbere de mazărice păroasă, obținută conform metodei descrise deja. Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g de pulbere de material vegetal, care s-au adus aseptice într-un Erlenmayer de 50 ml, steril. Peste pulberea fin măcinată s-au adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. S-a omogenizat prin agitare și s-a inoculat apoi cu 1 ml suspensie bacteriană, provenită din cultură de 12 ore pe mediu LB, normalizată la 10^8 ufc/ml. S-a menținut la agitator timp de 72 ore, la temperatura de 28°C, după care s-a separat cultura bacteriană prin centrifugare la 5000xg pentru 20 min la 4°C. Supernatantul a fost acidificat cu acid percloric, până la obținerea unei soluții de concentrație finală 5%. Supernatantul acidificat a fost derivatizat prin dansilare (Smith și Meeuse, 1996, Garcia-Moruno *et al.*, 2005, Cassan *et al.*, 2009). Poliaminele au fost sperate și identificate prin cromatografie în strat subțire, folosind amestecuri cloroform-trietanolamină (9:1) și n-hexan-acetat de etil (2:1) și comparându-le cu valorile compușilor standard dansilați. Plăcile de siliciu au fost observate în lumină UV, spoturile selectate au fost trecute cantitativ de pe placă într-o eprubetă. Din silicagel s-au eluat poliaminele dansilate cu soluție de metanol-toluen (9:1). Fluorescența a fost măsurată prin



spectrofluorimetrie, folosind lumină de excitare de 415 nm și lumină de emisie de 510 nm.

Rezultatele au demonstrat faptul că tulpina B100 are cea mai mare capacitate de producere de poliamine (compuși implicați mai ales în răspunsul plantelor la diferite forme de stres) din materialul vegetal de mazărice păroasă. Capacitatea sa este mai ridicată decât a tulpinii etalon Az39 de *Azospirillum brasiliense*, citată în literatura de specialitate ca fiind producătoare de poliamine. (Cassana *et al.*, 2009, Cadaverine production by *Azospirillum brasiliense* and its role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. Eur J. Soil Biology 45: 12-19).

Intr-o altă serie de experiment s-a testat capacitatea bacteriilor B100 de a solubiliza fosforul din compușii săi insolubili. Pentru determinarea capacității de solubilizare a fosforului mineral s-a utilizat mediul agarizat Pikovskaya, care conține (per litru): 0,5 g extract drojdie, 10 g glucoză, 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g KCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 15 g agar. Pe acest mediu bacteriile tulpinii B100 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat fosforul mineral.

Capacitatea de a solubiliza fosforul organic s-a testat pe mediul PSM (phytate screening medium), care conține (per litru): 10 g glucoză, 4 g fitat de sodiu, 2 g CaCl_2 , 5 g NH_4NO_3 , 0,5 g KCl, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15 g agar. Si pe acest mediu bacteriile tulpinii B100 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat și fosforul organic din fitați.

Pentru a se determina influența tulpinii B100 asupra biodisponibilității seleniului pentru plantele de grâu și porumb au fost realizate experimente de seră și câmp. În cadrul experimentelor de seră s-a lucrat cu substrat de creștere (prelivosol roșcat: mraniță: nisip - 2:1:1, repartizat în vase de vegetație cu suprafața de 0,050 m² și cu un volum de 15 l), la care s-a aplicat tratamente ale solului la locul de însămânțare ("în brazdă") în raport de 1 ml per vas de vegetație (corespunzând la 200 l/ha).

Boabele de porumb (PR36D79 Pioneer) și grâu (cv. Boema) au fost dezinfectate prin menținere 5 min în hipoclorit 5% și spălări repetate cu apă distilată. Boabele astfel dezinfectate au fost plasate în vasele de vegetație (2 boabe de porumb într-un singur cuib, 20 boabe de grâu uniform distribuite). La locul de însămânțare a fiecărui bob s-au aplicat tratamente cu soluția de aplicare, 1 ml pentru cele două boabe de porumb, câte 50 μl pentru fiecare bob de grâu. Soluția de aplicare conținea 10^7 sau 10^8 ufc tulpina B100, 3,0g/l zaharoză; 0,5g/l K_2HPO_4 ; 0,2g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g/l NaCl; 7 g/l plasmolizat de drojdie



suplimentat cu 100 ± 5 mg Se/100 plasmolizat 0,5g/l glutamat de sodiu; 0,2g/l K_2MoO_4 . Bacteriile au introduse ca suspensie concentrată în soluția obținută prin dizolvarea pe rând a fiecăruia ingredient în apă dură standard (considerată în literatura de specialitate ca fiind un etalon pentru apa de fântână).

Apa dură standard s-a obținut prin amestecarea a 68,5ml soluție A cu 17ml soluție B într-un berzelius de 1000ml. S-a diluat apoi cu circa 800ml apă distilată și s-a adus pH-ul la 6...7 prin adăugare de NaOH 0,1N. S-a transferat într-un vas cotat de 1000ml și s-a adus la semn cu apă distilată.

Soluția A s-a preparat astfel: S-au cântărit 4g carbonat de calciu și s-au transferat într-un flacon conic de 50ml, cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat încet 82 ml HCl 1N, agitând conținutul. Când tot carbonatul de calciu s-a dizolvat, s-a diluat soluția la circa 400ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu soluție de amoniac 1N până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000ml.

Soluția B s-a preparat astfel: s-au cântărit exact 1,613g oxid de magneziu și s-au transferat într-un flacon de 500ml cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat 82 ml HCl 1N. S-a reîncălzit încet până la dizolvare, s-a diluat la circa 400ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu o soluție de amoniac 1N până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000ml, s-a adus la semn cu apă distilată și s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon de polietilenă

Variantele experimentale care au fost realizate sunt:

V_1 – martor netratat cu (semințe / sol);

V_2 - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat;

V_3 – sol tratat "în brazdă" cu *B. amyloliquefaciens* B100 10^7 în soluția de aplicare;

V_4 - sol tratat "în brazdă" cu *B. amyloliquefaciens* B100 10^8 în soluția de aplicare

V_5 – martor tratament foliar ziua a 14-a de la răsărire (5 ml soluție 0,1 mg% Se sub formă de selenat de sodiu, echivalent a 10 g/ha seleniu).

Din experimentele realizate s-au recoltat cca. 2..3 g de material vegetal, atunci când grâul a ajuns la faza de înfrățire, respectiv când porumbul a ajuns în faza de 8 frunze complete. Materialul vegetal s-a cântărit cu o precizie de 1 mg și s-a adus într-un balon cu dop rodat de 250 cm^3 . S-au adăugat 20 cm^3 de acid azotic concentrat și s-a lăsat 2 zile la temperatura camerei. După aceea s-au adăugat 2 cm^3 acid percloric concentrat; iar la balon s-a atașat un refrigerent cu



spirală. S-a pus pe baie de nisip cu temperatura de 180 °C, la nișă chimică și s-a fiert timp de 16 ore. S-a demontat refrigerentul, sa-u adăugat 1 cm³ de acid sulfuric concentrat, după care s-a continuat evaporarea sub nișă cca. 3 ore, până la un volum de 1-2 cm³. Soluția s-a răcit, s-a adăugat 1 cm³ de acid azotic concentrat și s-a ținut pe baia de apă timp de 10 minute. Mineralizatul astfel obținut s-a transvazat cantitativ într-un pahar Berzelius de 100 cm³. La proba astfel dezagregat s-au adăugat 5 cm³ soluție de mascare după care pH-ul soluției s-a adus la 2 cu soluție de hidroxid de amoniu. S-au adăugat 5 cm³ de soluție 0,1% 2,3-diamino-naftalină după care s-a lăsat în întuneric două ore. După formarea complexului soluția s-a transvazat cantitativ într-o pâlnie de separare. Complexul piaszelenolic format a fost extras repetat cu ciclohexan 2x5 cm³ agitând intens 2 minute. Fazele organice s-au reunit și s-a determinat fluorescența la o lumină de excitare de 380 nm și la o emisie de 519 nm. Rezultatele obținute sunt prezentate în tab. 11. Ele demonstrează că tulpina B100 este o tulpină care are capacitate ridicată de a biodisponibiliza seleniul pentru plantele de grâu și porumb.

Tab.11. Nivelele de seleniu total (μg/kg) în țesuturile plantelor provenite din semințe tratate "în brazdă" cu o soluție seleniată și tulpina B100.

Varianta experimentală	Grâu	Porumb
V ₁ – martor netratat (semințe / sol);	44,3±5,2 ^c	46,3±4,5 ^c
V ₂ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat	54,6±4,6 ^b	56,7±3,7 ^b
V ₃ – sol tratat "în brazdă" cu <i>B. amyloliquefaciens</i> B100 10 ⁷ în soluția de aplicare	66,2±5,5 ^{ab}	64,6±6,3 ^{ab}
V ₄ - sol tratat "în brazdă" cu <i>B. amyloliquefaciens</i> B100 10 ⁸ în soluția de aplicare	72,4±4,8 ^a	72,8±5,3 ^a
V ₅ – martor tratament foliar ziua a 14	68,8±7,1 ^a	71,2±5,6 ^a

Tulpina B100 a fost testată și în cadrul unui experiment de câmp amplasat în Dobrogea, pe suprafețe mari. Bacteriile au fost aplicate în brazdă concomitent cu semănatul prin utilizarea de echipamente agricole specifice de aplicare soluții în brazdă, la presiuni de lucru cuprinse între 0,5 ... 3 bar a echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h. Soluția de aplicare a inclus aceleași componente, care însă au fost dizolvate în apă de fântână. Experimentul a fost realizat în pătrat latin, cu 4 variante în 4 repetiții.

Cele 4 variante ale experimentului de câmp au fost:

V₁ – martor netratat cu (semințe / sol);



V₂ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat;
V₃ - sol tratat "în brazdă" cu *B. amyloliquefaciens* B100, 10⁸ în soluția de aplicare;

V₄ - martor tratament foliar ziua la faza de spic în burduf (500 litri soluție 2 mg % Se, sub formă de selenat de sodiu echivalent a 10 g/ha seleniu).

Din experiment au fost prelevate probe în fenofaza de formare a boabelor și la recoltare, probe de boabe. În aceste probe s-a determinat nivelul de seleniu total prin digestia umedă a probelor de sol cu un amestec de acizi azotic, sulfuric, percloric pentru transformarea tuturor speciilor moleculare Se în seleniat (SeO₄²⁻), reducerea acestuia cu NaBH₄ la H₂Se și dozarea lui prin HG-AAS (generare de hidrură cu dozarea seleniului prin spectroscopie de absorbție atomică în flacără). Rezultatele sunt prezentate în tab.12.

Tab.12. Influența tratamentului de inoculare în brazdă cu tulpina B100 de *B. amyloliquefaciens* asupra preluării și acumulării de seleniu (μg/kg).

Varianta experimentală	Material vegetal	Grâu boabe
V ₁ - martor netratat (semințe / sol);	39,5±5,2 ^c	106,3±4,5 ^c
V ₂ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat	53,6±4,6 ^{bc}	116,7±5,7 ^b
V ₃ - sol tratat "în brazdă" cu <i>B. amyloliquefaciens</i> B100 10 ⁸ în soluția de aplicare	79,8±8,2 ^a	142,7±12,3 ^a
V ₄ - martor tratament foliar ziua a 14	62,8±7,1 ^b	121,±7,9 ^b

Tulpina B100 de *B. amyloliquefaciens* stimulează acumularea și preluare seleniului de către plantele de grâu în condiții de câmp și poate fi utilizată pentru biofortifierea cu seleniu a recoltei de grâu.

**TULPINĂ DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* CU
ACȚIUNI BENEFICE DIVERSE ASUPRA PLANTELOR DE CULTURĂ**

Revendicare

1. Tulpina de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B100, cu numărul de depozit NCAIM (P) B001362, caracterizată prin aceea că este antagonistă față de ciuperci fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Pythium debaryanum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum f. sp. radidis-lycopersici*, *Sclerotium bataticola* și față de bacteriile care afectează pomii fructiferi în timpul înfloritului, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas ice*⁺, datorită producerii de antibiotice lipopeptidice și policetidice și de enzime hidrolitice, protează și lactonază, și care are și activitate de stimulare a creșterii plantelor, datorită producerii endofite de factori de creștere, și capacitate de mineralizare a materialului vegetal, datorită producerii de amilază, fitază și celulază, și care solubilizează fosforul anorganic, biodisponibilizează seleniului și stimulează preluarea și acumularea seleniului de către plantele de grâu și porumb.

