



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00931**

(22) Data de depozit: **03/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/12/2017** BOPI nr. **12/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/10/2013 BOPI nr. **10/2013**

(73) Titular:
• **EURO ENVIROTECH S.R.L.**,
*STR. MALU ROȘU NR. 126, BL. 10-G,
AP. 31, PLOIEȘTI, PH, RO*

(72) Inventatori:
• **NICULAE GHEORGHE**, *STR. MALU ROSU
126, BL. 10G, AP. 31, PLOIESTI, PH, RO;*
• **OANCEA FLORIN**, *STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **RUSEN RODICA**, *SAT PLOIEȘTIORI
NR. 823G, COMUNA BLEJOI, PH, RO;*
• **DONI MIHAELA**, *BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUÇUREȘTI, B, RO;*
• **RĂUT IULIANA**,
*ALEEA BARAJUL BISTRITA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;*

• **CĂLIN MARIANA**,
*STR. CETATEA DE BALTĂ NR. 41, BL. 07A,
SC. 2, ET. 6, AP. 91, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **JECU MARIA-LUIZA**,
*STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**JP 2008289445 (A); SEBASTIEN THIERRY
& COL., "PSEUDOXANTHOMONAS
MEXICANA SP. NOV. AND
PSEUDOXANTHOMONAS JAPONENSIS
SP. NOV., ISOLATED FROM DIVERSE
ENVIRONMENTS, AND EMENDED
DESCRIPTIONS OF THE GENUS
PSEUDOXANTHOMONAS FINKMANN ET
AL. 2000 AND OF ITS TYPE SPECIES",
INTERNATIONAL JOURNAL OF
SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY
MICROBIOLOGY, VOL. 54,
PP. 2245-2255, 2004**

(54) **TULPINĂ DE *PSEUDOXANTHOMONAS MEXICANA*
ȘI COMPOZIȚIE CARE O CONȚINE**



RO 128930 B1

1 Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Pseudoxanthomonas mexicana* care are
2 capacitatea de a degrada hidrocarburi alifaticе și aromatice, stimulează creșterea plantelor
3 și este antagonistă pentru o serie de agenți fitopatogeni, cât și la o compoziție cu eliberare
4 controlată care conține această tulpină, destinată proceselor de bio- și fitorizoremediere a
5 solurilor poluate cu produse petroliere, inclusiv a celor contaminate cu hidrocarburi aromatice
6 policiclice potențial cancerigene.

7 Sunt cunoscute tulpini de microorganisme, în special de bacterii din filumul
8 *Proteobacteria*, care degradează hidrocarburi aromatice și alifaticе, cât și derivați ai acestora,
9 din solurile poluate. Brevetul **US 5543317** se referă la o tulpină de *Pseudomonas cepacia*
10 (specie ulterior reclasificată ca *Burkholderia cepacia*) PR123, inițial denumită G4 5223 Phe,
11 depozitată sub numărul NRRL B-18811, care are capacitatea de a degrada produse chimice
12 periculoase din categoria derivaților clorurați ai alcanilor, tricloretilenă, 1,1-diclorețan, cis-1-2-
13 diclorețilenă, cis-1-2-diclorețilenă, și hidrocarburi aromatice, *p*-toluen, fenol, *o*-cresol, *m*-cresol,
14 *o*-xilen și benzen. Cererea de brevet **KR 20030066948** protejează o tulpină de *Burkholderia*
15 *cepacia* 2A-12, depozitată sub numărul KCTC 10163BP, cu capacitatea ridicată de a degrada
16 hidrocarburile policiclice aromatice, și un procedeu de bioremediere care implică stropirea
17 zonei contaminate cu respectiva tulpină și cu un extract de drojdie.

18 **CN 102250788 (A)** descrie o tulpină de *Stenotrophomonas maltophilia*, depozitată
19 sub numărul CGMCC 4839, cu capacitate ridicată de a utiliza metilbenzenul/toluenul ca
20 unică sursă de carbon și energie, și de a degrada și tolera toluenul.

21 Cele două specii de proteobacterii menționate mai sus, *Burkholderia cepacia* și
22 *Stenotrophomonas maltophilia*, sunt specii cu o mare versatilitate ecobiotehologică, care
23 degradează compuși organici poluanți, inclusiv hidrocarburi și derivați ai acestora, au
24 activitatea antagonistă față de fitopatogeni și de biostimulare a plantelor, biosintetizează
25 compuși utili, inclusiv antibiotice (a se vedea, de exemplu, trecerile în revistă
26 **Mahenthiralingam et al., 2008, J. Appl. Microbiol. 104:1539-1551** pentru *B. cepacia* sau
27 **Ryan et al. 2009, Nat. Rev. Microbiol 7: 514-525** pentru *S. maltophilia*). Aceste specii sunt
28 însă și patogeni oportuniști umani, cu mare rezistență la antibiotice, care produc infecții intra-
29 spitalicești grave (a se vedea, de exemplu, trecerile în revistă **Govan și Deretic, 1996.**
30 **Microbiol. Rev. 60:539-574** pentru *B. cepacia* sau **Looney, 2009 Lancet Infect. Dis. 9:**
31 **312-323** pentru *S. maltophilia*). Din acest motiv, folosirea lor în aplicații de bio- sau
32 fitorizoremediere implică riscuri pentru sănătatea umană.

33 Brevetul **JP 3618785** dezvăluie un procedeu prin care bioremedierea se realizează
34 cu celule lizate de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, tulpina KK01, depozitată ca FERM-
35 BP-4235. În acest fel, se înlătură riscurile ulterioare pentru sănătatea umană, dar un astfel
36 de procedeu implică folosirea unei cantități foarte mari de lizat de celule, care să furnizeze
37 enzimele necesare decontaminării, și nu mai oferă avantajul folosirii unei cantități (relativ)
38 mici de microorganisme din tulpina cu eficiență ridicată în biodegradarea poluanților organici,
39 ca inoculant care să colonizeze ulterior nișa ecologică, inclusiv rizosfera plantelor. Uzatul de
40 celule nu este util în procesele de fito(rizo)remediere, în care degradarea compușilor organici
41 se realizează prin acțiunea combinată a rădăcinilor plantelor (și a compușilor exudați de
42 rădăcini) și a tulpinilor de microorganisme care se dezvoltă în rizosferă, co-metabolizând
43 exsudatele plantelor și compuși organici poluanți, și susținând dezvoltarea plantelor (pentru
44 descrierea proceselor și a mecanismelor implicate, a se vedea, de exemplu, trecerile în
45 revistă **Kuiper et al. 2004. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:6-15; Lugtenberg și Kamilova,**
2009. Annu. Rev. Microbiol. 63:541-556).

RO 128930 B1

Este necesară identificarea unor tulpini de proteobacterii cu o versatilitate ecobio-tehnologică similară speciilor *B. cepacia* și *S. maltophilia*, utile atât în bioremedierea directă, cât și împreună cu rădăcinile plantelor pe care le stimulează și le protejează împotriva diferiților agenți fitopatogeni. Brevetul **RU 2406758** revendică tulpina *Sinorhizobium meliloti* P221, depozitată cu numărul B-9442 la Colecția Națională Rusă de Microorganisme Industrial, VKPM, care degradează hidrocarburile aromatice policiclice, fiind utilă atât pentru bioremediere, cât și pentru fito(rizo)remediere. Pentru această tulpină nu au fost însă descrise caracteristici de antagonism pentru agenții fitopatogeni, deci această tulpină doar stimulează plantele, fără a le proteja împotriva atacului patogenilor.

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este prezentarea unei tulpini izolată din habitate naturale, care, concomitent, prezintă caracteristici de: degradare a hidrocarburilor alifaticе și aromatice, stimulare a creșterii plantelor și antagonism pentru o serie de agenți fitopatogeni. Pentru astfel de tulpini este necesară și realizarea unei compoziții cu eliberare controlată, care să asigure o activitate optimă a apei, pentru o supraviețuire pe termen lung a formelor inactive metabolic de proteobacterii, să faciliteze colonizarea rizosferei cu respectivul micro-organism, prin eliberare treptată, și să protejeze proteobacteriile de acțiunea toxică a hidrocarburilor în perioada critică de reactivare a formelor inactive metabolic.

Această invenție se referă la tulpina de *Pseudoxanthomonas mexicana*, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) B 001414 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta. Tulpina de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 a fost selectată din peste 120 de izolate, provenite din probe de sol contaminat cu hidrocarburi, și crescute pe mediu minimal suplimentat cu fenantren ca unică sursă de carbon, prezentând caracteristici superioare de:

- degradare a hidrocarburilor aromatice și alifaticе în diferite medii, inclusiv sol, și inclusiv în combinație cu rădăcinile plantei de lucernă;

- producere de biofilme *in vitro* și *in situ*;

- biosinteză de compuși volatili cu acțiune de stimulare a creșterii plantelor și de compuși care solubilizează fosforul din formele sale insolubile, organice și anorganice;

- stimulare a germinației lucernei și a dezvoltării plantulelor de lucernă în condiții controlate;

- antagonism *in vitro* față de ciupercile fitopatogene de sol, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, *Aphanomyces euteiches*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*;

- protecție *in vivo* a plantelor de lucernă față de ciupercile fitopatogene de sol, *R. solani*, *F. graminearum*, *P. ultimum*, *P. megasperma f. sp. medicaginis*, *A. euteiches*, care produc căderea plantulelor;

- inocuitate în testul pe *Galleria mellonella*.

Compoziția cu eliberare controlată pe baza tulpinii *P. mexicana* P32 este alcătuită din: 76 părți făină integrală de ovăz, 4,8 părți esteri etilici ai acizilor grași, 4 părți alcool polivinilic, 3,5 părți lecitină, 0,75 părți săpun de potasiu, 0,45 părți glicerol, 0,4 părți grăsimi din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă, și minimum 10⁸ ufc/g *P. mexicana* P32.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- posibilitatea bioremedierii unor soluri contaminate cu produse petroliere, inclusiv cu hidrocarburi cancerigene, prin introducerea unei suspensii din tulpina *P. mexicana* P32 sau a granulelor de compoziție cu eliberare controlată în sol;

- posibilitatea fitorizoremedierii solurilor contaminate cu produse petroliere, prin utilizarea ca tratament în brazdă a unei suspensii din tulpina *P. mexicana* P32 sau a granulelor de compoziție cu eliberare controlată;

RO 128930 B1

1 - stimularea și protecția culturii de lucernă folosite împreună cu tulpina de *P.*
2 *mexicana* P32 pentru fitorizoremediere, cu reducerea costurilor de întreținere a culturii și a
3 eficienței procesului de fitorizoremediere;

4 - asigurarea unei supraviețuirii de lungă durată a formelor inactive metabolic de pro-
5 teobacterii *P. mexicana* P32 în compoziția cu eliberare controlată, datorită menținerii unei
6 activități optime a apei în substrat, sub acțiunea umectantă a glicerinei și repelentă a
7 compușilor hidrofobi;

8 - asigurarea unei colonizări uniforme și reproductibile de către tulpina P32 a solului,
9 în cazul utilizării compoziției cu eliberare controlată, propagule fiind eliberate treptat din com-
10 poziția conform prezentei invenții și protejate de acțiunea toxică a hidrocarburilor, în perioada
11 critică de reactivare a formelor inactive metabolic, ca urmare a acumulării preponderente a
12 hidrocarburilor în componenta hidrofobă a compoziției.

13 Invenția va fi descrisă în detaliu în următoarele exemple:

Exemplul 1

14 Izolarea tulpinii P32 s-a realizat din probe de sol contaminate cu petrol, prelevate din
15 zona Brazi, Ploiești, România. Pentru izolare s-a folosit un mediu minimal (KH_2PO_4 1,0 g/l,
16 K_2HPO_4 1,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4NO_3 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, CaCl_2 20 mg/l și $\text{FeCl}_3 \cdot$
17 $6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/l), suplimentat cu fenantren ca unică sursă de carbon. Substanțele chimice
18 folosite pentru mediul de izolare au provenit de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). pH-ul
19 mediului s-a ajustat la 7,2 cu 0,1 N NaOH, iar mediul a fost sterilizat prin autoclavare la
20 121°C , timp de 20 min.

21 Probele de sol prelevate din zone poluate cu petrol au fost aduse la o granulație mai
22 mică de 0,2 mm, prin sitare, și inoculate pe un mediu minimal steril, suplimentat cu 50 mg/l
23 fenantren. Mediul s-a menținut la 32°C pe un agitator orbital (Unimax 1010, Heidolph
24 Instrument Schwabach, Germania). După o săptămână, o parte din această probă a fost
25 folosită ca inocul pentru un mediu minimal proaspăt, suplimentat cu 75 mg/l fenantren, care
26 a fost menținut alte 7 zile la 32°C pentru îmbogățire, pe mediu aerat și agitat pe agitator
27 orbital. Această procedură s-a repetat de 10 ori, cu o creștere a conținutului de fenantren de
28 fiecare dată cu 25 de mg/l, până la atingerea concentrației de 300 mg/l. Din ultimele probele
29 îmbogățite pe mediu minimal, cu 300 mg/l fenantren, s-au realizat diluții care au fost etalate
30 pe 25 ml mediu minimal agarizat cu 20 g/l, sterilizat prin autoclavare la 121°C , timp de
31 20 min, și repartizat în plăci petri sterile, cu diametrul de 9 cm. După repartizarea mediului
32 în plăci petri și răcirea acestuia, pe suprafața mediului agarizat au fost răspândiți 0,5 ml de
33 soluție fenantren 0,25% în acetonă, corespunzând la o concentrație finală de fenantren în
34 mediul agarizat de 50 mg. După evaporarea acetonei în condiții aseptice, mediul a fost
35 inoculat cu diluții din probele îmbogățite în bacterii care utilizează hidrocarburi aromatice ca
36 unică sursă de carbon și energie. Pe baza caracterelor morfologice, au fost separate 121 de
37 izolate, care apoi au fost menținute pe mediu minimal agarizat suplimentat cu fenantren
38 50 mg/l, preparat ca mai sus.

39 Din cele 121 de tulpini s-a selectat tulpina P32, pe baza testelor care vor fi detaliate
40 în cadrul celorlalte exemple. Pentru încadrarea taxonomică a tulpinii P32, s-a folosit o
41 abordare polifazică, tulpina fiind caracterizată din punct de vedere morfologic (tabelul 1),
42 biochimic și fiziologic (tabelul 2) al compoziției de acizi grași celulari și al secvenței parțiale
43 16S rADN.

RO 128930 B1

Tabelul 1 1

Morfologia coloniilor și celulelor de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 pe mediu LB agarizat, după cultivare timp de 24 h 3

Caractere morfologice specifice pentru <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> P32		
Colonia	forma: circulară	5
	aspectul suprafeței: netedă, convexă	7
	transparență: translucidă	9
	culoarea: gălbui pal până la bej	
Celule:	forma: bastonaș	11
	dimensiuni: 0,7...0,8 x 1,5...2,5 μm	13
	aranjament flagelar un singur flagel polar	15

Tabelul 2 17

Caracteristicile fiziologice ale tulpinii P32

Testul biochimic	P32	
Reacția Gram	-	19
Reacția Voges-Proskauer	+	
Hidroliza amidonului	+	21
Hidroliza gelatinei	+	
Urează	-	23
Reducerea NO ₃ → NO ₂	-	
Creștere anaerobă	-	25
Oxidază	+	
Catalază	+	27
Lecitinază	-	
Sursa de carbon:		29
gentiobioză	-	
galactoză	-	31
zaharoză	+	
maltoză	-	33
glucoză	-	
xiloză	+	35
manoză	+	
fructoză	-	37
trehaloză	-	
sorbitol	+	39
manitol	+	
inozitol	-	41
glicerol	+	
meso-eritritol	+	43
D/L prolină	+	
adipat	-	45
fenilacetat	+	
malat	+	47

1 Creșterea tulpinii P32 de *P. mexicana* este posibilă în prezența a 0...40 g NaCl la 1 l
de mediu, la 10...37°C și la un pH cuprins între 5,8 și 9,75 și este optimă la 30...37°C,
3 pH 7...8, fără NaCl.

4 Compoziția în acizi grași celulari a fost determinată folosind un sistem automat GC
5 Sherlock Microbial Identification System (MIDI, Newark, SUA) și procedura standard MIDI
(**Sasser, 1990, în Methods in Phytobacteriology, pp. 119-204. Z. Klement, K. Rudolph
7 și D. C. Sands eds., Budapest: Akademiai Kiado**). Acizii grași celulari predominanți sunt,
în ordinea descreșterii abundenței: 15:0 iso, 17:1 iso cis7, 16:0 iso, 11:0 iso 3-OH și 11:0 iso,
9 corespunzând profilului de acizi grași celulari specifici speciei *Pseudoxanthomonas
mexicana* (**Thierry et al., 2004. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2245-2255**).

11 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
13 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
15 gel; purificarea ADN-ului ribozomal; precipitarea și uscarea ADN-ului ribozomal. Secvenție-
rea nucleotidică a fost realizată cu metoda Dye Terminator Cycle Sequencing (**Perkin Elmer,
17 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
19 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
21 Local Alignment Search Tool). Secvența parțială de 527 perechi baze a prezentat o simi-
laritate de 100% cu secvența tulpinii de referință AMX 26BT/ATCC 700993T (**Thierry et al.,
23 2004. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2245-2255**).

Exemplul 2

25 S-a testat abilitatea diferitelor izolate de a crește pe un mediu lichid minimal supli-
mentat cu diferiți compuși xenobiotici, ca singură sursă de carbon și energie. A fost folosit
27 același mediu minimal ca în exemplul 1 (KH₂PO₄ 1,0 g/l, K₂HPO₄ 1,0 g/l, NaCl 0,5 g/l,
NH₄NO₃ 1,0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g/l, CaCl₂ · 2H₂O 20 mg/l și FeCl₃ · 6H₂O 5 mg/l), la care
29 s-au adăugat 1 g/l din diferiți compuși xenobiotici, respectiv acetonă (cetone), n-hexan
(alcani), benzen, toluen și xilen (hidrocarburi aromatice), naftalină, fenantren și benzpiren
31 (hidrocarburi aromatice policiclice), carbazol, fenol, motorină și ulei mineral (alte produse
petoliere). Mediul minimal suplimentat cu xenobiotice a fost repartizat aseptice în plăci de
33 microtitrare cu 96 godeuri, care apoi au fost inoculate cu diferitele tulpini testate, fiecare
tulpină fiind inoculată în cele puțin 4 repetiții. Plăcile inoculate au fost incubate la 32°C, timp
35 de 72 h. După 72 h, în plăcile de microtitrare s-a determinat densitatea optimă, folosind un
cititor de plăci multimod PolStar Optima (BMG Labtech, Oretenberg, Germania). Dintre toate
37 izolatele testate, tulpina P32 a prezentat spectrul cel mai larg de utilizare a diferitelor
xenobiotice ca singură sursă de carbon și energie. Capacitatea tulpinii P32 de a crește prin
39 utilizarea diferiților compuși xenobiotici ca singură sursă de carbon și energie este prezentată
în tabelul 3.

Tabelul 3

43 *Capacitatea tulpinii P32 de a crește prin utilizarea diferiților compuși xenobiotici ca
singură sursă de carbon și energie*

Compus xenobiotic	Creștere*
Cetone și alcani	
Acetonă	+++
nhexan	+ +

Tabelul 3 (continuare)

Compus xenobiotic	Creștere*
Hidrocarburi aromatice	
Benzene	+
Toluen	+
Xilen	-
Hidrocarburi aromatice policiclice	
Fenantren	+++
Naftalină	±
Benzpiren	+++
Alți compuși petrolieri	
Carbazol	++
Fenol	++
Motorină	+++
Ulei mineral	+++

+++ foarte intensă $DO_{600} > 1,0$; ++ intensă, $DO_{600} > 0,5$; + medie $DO_{600} > 0,1$; + slabă $DO_{600} > 0,05$; ± f. slabă $> 0,01$; - fără creștere - 0

Exemplul 3

S-a testat capacitatea izolatelor de a forma biofilme *in situ* și *in vitro*. Capacitatea de a forma biofilme este dependentă de sensibilitatea de grup (quorum sensing, QS), mediată de molecule - semnal de N-acil-homoserin-lactonă (AHL) (**Van Houdt et al., 2007, FEMS Microbiol. Rev. 31, 407-424**). S-au realizat diferite teste pentru a se determina producerea de semnale QS (AHL) de către bacteriile *P. mexicana* P32 și producerea de biofilme pe diferite suprafețe.

Pentru evidențierea moleculelor implicate în sensibilitatea de grup (quorum sensing) s-au folosit două tulpini biosenzor, *Chromobacterium violaceum* CV026 și *A. tumefaciens* NT1.

Tulpina mutantă CV026 a fost obținută din tulpina sălbatică *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, și este folosită ca biosenzor pentru detectarea moleculelor de tip AHL. *Chromobacterium violaceum* CV026 produce pigmenți de culoare violetă, numiți violesceină, doar atunci când în mediu sunt prezente molecule de AHL care au lungimea grupei de acil între C4 și C8.

Agrobacterium tumefaciens NT1 este o bacterie mutantă, obținută din tulpina sălbatică, prin fuzionarea genei Tra cu gena LacZ. Astfel, gena LacZ nu mai poate sintetiza molecule de AHL, și enzima *p*-galactozidază nu poate fi activată. Prin urmare, X-galul prezentă în mediu nu poate fi descompusă de către *Agrobacterium tumefaciens* NT1, și astfel mediul nu se decolorează. Dacă AHL este prezent în mediu (ex. fiind sintetizată de alte bacterii), atunci apare o culoare albastru-verzui. Tulpina biosenzor de *A. tumefaciens* NT1 produce pigmenți de culoare verzui-albăstrui doar atunci când în mediu sunt detectate molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei de acil între C4 și C12.

Tulpina P32 de *P. mexicana* și tulpinile biosenzor CV026 și NT1 au fost împrăpătate pe mediul agarizat Luria-Bertani (10 g bacto-triptonă; 5 g extract de drojdii; 10g NaCl; 20 g agar-agar; pH 7,2, sterilizat 20 min la 121°C) cu 24 h înainte de utilizare. În cazul tulpinilor biosenzor, mediul LB s-a suplimentat cu cloramfenicol (concentrație finală de 5 μg/ml) sau kanamicină (concentrație finală de 50 μg/ml).

RO 128930 B1

1 Testul propriu-zis a constat în trasarea unui striu, în centrul unei plăci Petri, cu tulpina
biosenzor CV026 sau NT1, apoi, perpendicular pe aceasta, s-a striat tulpina P31 la o
3 distanță de 3 mm față de tulpina martor. Plăcile s-au incubat la 28°C și au fost analizate la
24 h. Apariția culorii violet în zona de creștere a tulpinii Cv026, respectiv a culorii verzi în
5 zona de creștere a tulpinii NT1, a indicat prezența moleculelor de acil-homoserin-lactonă pro-
duse de tulpina P32. Testul a fost repetat de trei ori, cu ambele tulpini biosenzor. De fiecare
7 dată, s-a evidențiat apariția culorii specifice diferitelor tulpini biosenzor, fapt care demons-
trează producerea de către tulpina P32 de molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care
9 au lungimea grupei acil între C4 și C12.

Capacitatea de formare de biofilme *in vitro* a fost analizată prin metoda spectrofoto-
11 metrică. Bacteriile P32 au fost crescute pe mediu lichid LB, la 28°C, până la atingerea unei
densități optice $OD_{600} = 2,0$. Aceste culturi s-au transferat apoi aseptice pe plăci de micro-
13 titrare cu 96 de godeuri, cu 8 repetiții din fiecare tip de tulpină testată.

Plăcile s-au incubat la 25°C pentru 24 h. Turbiditatea celulelor se determină folosind
15 un cititor de plăci multimod PolStar Optima (BMG Labtech). După perioada de incubare de
24 h, mediul lichid s-a spălat de 3 ori cu apă sterilă pentru a se îndepărta bacteriile slab
17 asociate. Plăcile s-au uscat la temperatura camerei timp de 45 de min, după care s-a colorat
fiecare godeu cu o soluție de 0,1% de verde malachit, timp de 20 de min. S-a spălat colo-
19 rantul de 3 ori cu apă sterilă și s-a observat biofilmul colorat în verde. Analiza cantitativă s-a
realizat prin spălarea colorantului cu etanol și cuantificarea prezenței verdului malachit cu
21 reader de plăci de microtitrare la 620 nm. Rezultatele obținute pentru diferite tulpini testate
sunt prezentate în tabelul 4, comparativ cu tulpina P32 și pentru alte izolate testate. Se
23 remarcă faptul că tulpina P32 produce o cantitate semnificativă de biofilm *in vitro*.

25 *Tabelul 4*

27 *Valorile absorbantei colorantului verde de malachit eliberat din biofilmele formate pe
pereții godeurilor din placa de microtitrare*

nr.	martor	P12	P16	P15	S16	P32	P23	P43	P60	P92	P34	P52
29 1	0,05	0,16	0,08	0,24	0,12	0,49	0,17	0,33	0,35	0,12	0,37	0,42
31 2	0,04	0,11	0,07	0,28	0,08	0,53	0,15	0,35	0,32	0,15	0,39	0,42
33 3	0,07	0,11	0,13	0,27	0,09	0,56	0,11	0,29	0,33	0,14	0,38	0,37
35 4	0,05	0,11	0,09	0,21	0,1	0,54	0,17	0,31	0,29	0,15	0,4	0,42
37 5	0,08	0,1	0,1	0,24	0,09	0,48	0,12	0,29	0,26	0,12	0,33	0,37
39 6	0,06	0,07	0,07	0,18	0,07	0,55	0,17	0,28	0,33	0,12	0,26	0,25
41 7	0,07	0,13	0,1	0,25	0,09	0,54	0,12	0,32	0,34	0,12	0,34	0,33
43 8	0,08	0,10	0,12	0,25	0,12	0,56	0,18	0,34	0,29	0,22	0,38	0,33
45 medie	0,063	0,111	0,095	0,240	0,095	0,531	0,149	0,314	0,314	0,143	0,356	0,364

39 Pentru testarea producerii *in situ* de biofilme s-a lucrat pe varianta determinării
biofilmului format pe nisip. Într-o placă cu 24 godeuri s-au adăugat 0,5 ml de nisip steril
41 (granulație fină 0,2...0,4 mm). Peste acest nisip s-au adus 0,5 ml suspensie bacteriană
preparată ca mai jos. Bacteriile P32 s-au crescut pe mediu LB până la atingerea unei $DO_{600} =$
43 $= 2,0$. S-au spălat și s-au resuspendat în același mediu, apoi s-a incubat la 28°C. După 48 h,
s-au prelevat aseptice 0,1 ml de amestec nisip - mediu de cultură, s-au adus într-un tub de
45 centrifugă steril cu masă cunoscută, s-a centrifugat și s-a îndepărtat aseptice supernatantul.
S-a cântărit nisipul depus centrifugal în fiecare din cele 24 tuburi de centrifugă. S-au adăugat
47 apoi 0,15 ml soluție 10 mM $MgSO_4$ în toate tuburile și s-a vortexat. Din supernatantul în care
s-au reluat bacteriile s-a determinat numărul de ufc prin tehnica diluțiilor.

RO 128930 B1

Tulpina P32 de *Pseudoxanthomonas mexicana* a fost comparată, din punct de vedere al capacității de formare biofilme, cu tulpina HRO-C48 (= DSMZ12502) de *Serratia piymuthica*, tulpină recunoscută pentru capacitatea de protecție a rizosferei plantelor prin formare de biofilme (Liu et al, 2007, FEMS Microbiol. Lett. 270:299-305). Din tulpina P32 s-au recuperat $6,5 \cdot 10^8 \pm 5,1 \cdot 10^7$ ufc g^{-1} de nisip, comparativ cu $3,7 \cdot 10^8 \pm 6,3 \cdot 10^7$ ufc pentru tulpina HRO-C48.

Pentru testarea capacității de formare de biofilme *in situ* pe organele plantei, s-a lucrat cu testul reizolării de pe rădăcinuțele plantulelor de lucernă (*Medicago sativa* ev. *Magnat*). Bacteriile au fost cultivate peste noapte pe mediu lichid LB. S-a normalizat suspensia la $2 \cdot 10^8$ ufc/ml cu mediu LB steril, iar din această suspensie s-au depus 10 μ l pe rădăcinuțele unor plante de lucernă gnotobiotice (provenite din semințe de lucernă dezinfectate la suprafață, germinate timp de 5 zile în condiții aseptice, la întuneric, la 28°C). Depunerea s-a realizat pe colet, la marginea dintre rădăcinuță și cotiledon. S-a incubat timp de 24 h, după care rădăcinuța a fost detașată steril din plantulă și depusă aseptically într-un tub de centrifugă. Peste rădăcinuță s-au adăugat 0,15 ml soluție 10 mM $MgSO_4$ și s-a vortexat pentru 5 min. Supernatantul s-a reluat prin sucțiune, iar rădăcinuța a fost extrasă din tubul de centrifugă și uscată prin depunere aseptically pe hârtie de filtru sterilă. Rădăcinuța uscată a fost depusă aseptically pe mediu semisolid CM-agaroză (10 g/l casaminoacizi, 10 g/l manitol, 3 g/l agaroză), suplimentat cu 10 ml soluție sterilă nutritivă. Soluția sterilă nutritivă a fost obținută prin diluarea de 100 ori a unei soluții stoc (H metal) și sterilizarea prin filtrare. Pentru obținerea a 200 ml de soluție stoc H metal, s-a procedat după cum urmează. S-au obținut 100 ml soluție de lucru prin diluare de 500 ori a unei soluții stoc care conținea: 1,5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, dizolvată mai întâi; 50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 100 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 100 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 50 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 50 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ și 20 mg H_3BO_3 . La acești 100 ml soluție s-au adăugat 50 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și 50 mg acid ascorbic.

Din rădăcinuțe s-au obținut colonii dendritice, al căror aspect specific demonstrează existența unor caracteristici de mobilitate asociate formării de biofilme pe organele subterane ale plantelor de cultură.

În concluzie, tulpina P32 de *Pseudoxanthomonas mexicana* formează biofilme *in vitro* și *in situ*, atât pe particule minerale, cât și pe rădăcinile plantelor.

Exemplul 4

S-a testat capacitatea tulpinii de a produce P32 de producere a compușilor volatili cu acțiune de stimulare a creșterii plantelor, de solubilizare a fosforului din formele sale insolubile, organice și anorganice și de stimulare a germinăției lucernei și a dezvoltării plantulelor de lucernă în condiții controlate. Producerea de compuși volatili cu rol în fitostimulare a fost demonstrată prin determinarea producerii de acetoină. Acetoina (3-hidroxi-2-butanona, HB) este un metabolit fiziologic important, excretat de microorganisme atunci când sunt crescute într-un mediu de cultură conținând glucoză sau alte surse de carbon degradabile pe calea Embden-Meyerhof. Formarea acetoină este pusă în evidență prin reacția Voges-Proskauer și servește drept marker în clasificarea microbiană, având un rol important în reglarea ratei NAD/NADH și în stocarea carbonului. Producerea de acetoină demonstrează și capacitatea respectivelor tulpini de a produce 2,3-butandiol, compus volatil cu rol în stimularea creșterii plantelor (Ryu et al., 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:4927-4932). Tulpina P32 a fost crescută 24 h în LB (incubată la 28°C cu agitare), apoi 100 μ l cultură au fost inoculați în 5 ml mediu lichid cu glucoză (protezo - peptonă 7 g, glucoză 5 g, NaCl 5 g, apă distilată până la 1000 ml), distribuit în eprubete, sterilizat 15 min la 1 atm. Cultura a fost preparată în 3 repetiții și testată pentru producerea de acetoină la 3, 5 și 7 zile după inoculare și incubare la 28°C. Ca reactiv, s-a utilizat o soluție 10% NaOH, câte 1 ml distribuit în fiecare eprubetă

RO 128930 B1

1 și, ulterior, adăugarea în fiecare eprubetă a 1 mg de creatină, mixtura fiind agitată viguros.
Apariția culorii roșii, după 30...60 min, la temperatura camerei, a indicat prezența acetil-metil-
3 carbinolului, deci o reacție pozitivă, ceea ce arată capacitatea bacteriilor P32 de a produce
compuși volatili care stimulează creșterea plantelor.

5 Într-o altă serie de experiment, s-a testat capacitatea bacteriilor P32 de a solubiliza
fosforul din compușii săi insolubili. Pentru determinarea capacității de solubilizare a fosforului
7 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
9 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 15 g agar. Pe acest mediu, bacteriile tulpinii P32 au
produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat fosforul mineral.

11 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
13 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 P32 au produs halou în jurul coloniilor, deci au
15 solubilizat și fosforul organic din fitați.

Activitatea de stimulare a creșterii plantelor a tulpinii P32 a fost pusă în evidență prin
17 efectuarea de experimente în condiții controlate, folosind plantule de lucernă, *Medicago*
sativa, ev. Magnat. În vederea inoculării, semințele de lucernă au fost dezinfectate în două
19 etape. Prima dezinfecție a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 s cu agitare la 60 rot/min.
După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă.

21 Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4%, timp de
15 min. Ulterior, au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 în 25 min, timp de 2 h.
23 Semințele astfel dezinfectate au fost păstrate la 4°C, la întuneric, pe hârtie de filtru umectată.

Tulpina P32 a fost cultivată pe mediu LB lichid la 28°C și 150 rot/min, timp de 16 h.
25 Inocularea semințelor s-a realizat la două concentrații, de 10^6 sau 10^8 ufc/ml. Bacterizarea
semințelor a fost efectuată prin imersare în suspensie bacteriană timp de 15 min, la tempera-
27 tura camerei, și agitare la 20 rot/min. Ca martor, au fost folosite semințe de lucernă, sterili-
zate ca mai sus și imersate în apă distilată sterilă.

29 Semințele de lucernă inoculate conform metodei descrise mai sus au fost puse la ger-
minat în plăci Petri (cu diametrul de 9,4 cm), pe apă agarizată 0,8%, în număr de 20 de
31 semințe/placă, în 5 repetiții. Fiecare variantă a constat în 100 semințe. Temperatura de incu-
bare a fost de 28°C. S-au făcut observații în ceea ce privește numărul semințelor germinate
33 la 24, 48 și 72 h.

Pentru determinarea influenței bacteriilor P32 asupra dezvoltării plantulelor de grâu,
35 semințele de lucernă inoculate cu suspensie bacteriană în concentrație de 10^6 sau 10^8 ufc/ml
au fost distribuite în vase Petri (cu apă agarizată, diametrul plăcilor de 9,4 cm), câte
37 10 semințe/placă, în 3 repetiții (30 semințe per variantă). Peste apa agarizată au fost adău-
gați câte 5 ml de mediu mineral nutritiv pentru plante, cu formula: 0,4 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 2,4 g
39 KNO_3 ; 1,6 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,8 g MgSO_4 , agarizat cu 2 g/l. Plăcile au fost incubate la întuneric,
la 28°C. S-au efectuat observații în ceea ce privește efectul de stimulare al creșterii rădăcinu-
41 țelor și plantulelor de lucernă după 72 h, determinându-se lungimea rădăcinuței și înălțimea
plantulei.

43 Determinările referitoare la influența tulpinii P32 asupra germinării și dezvoltării
plantulelor au fost realizate comparativ față de un martor reprezentat de apa distilată sterilă.
45 Rezultatele, prezentate în tabelele 5 și 6, susțin existența unui efect fitostimulator exercitat
de bacteriile P32 asupra plantulelor de lucernă, și în special asupra sistemului radicular.

Tabelul 5

Influența inoculului bacterian cu tulpina P32 asupra capacității de germinare a semințelor de lucernă (Medicago sativa ev. Magnat)

Tulpină bacteriană Tr	Concentrație inocul (ufc/ml)	% de semințe germinate după		
		24 h	48 h	72 h
Mt, apă distilată sterilă	-	72	86	90
P32, <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	10 ⁶	84	90	98

Tabelul 6

Testarea efectului de stimulare a creșterii plantelor de lucernă (Medicago sativa ev. Magnat) de către tulpina P32 (72 h post-inoculare)

Tulpină bacteriană	Concentrație inocul (ufc/ml)	Germinație		Lungime răd. (cm)	Înălțime plantulă (cm)
		Din 30 sem.	%		
P32	10 ⁶	29	96,7	3,35	2,32
P32	10 ⁸	29	96,7	3,87	2,43
Martor neinoculat	-	25	83,3	2,68	2,24

În concluzie, tulpina P32 de producere de compuși volatili care au fost implicați în stimularea creșterii plantelor solubilizează fosforul din formele sale insolubile, organice și anorganice, și stimulează germinația lucernei și dezvoltarea plantulelor de lucernă în condiții controlate.

Exemplul 5

S-a testat antagonismul *in vitro* față de ciupercile fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aphanomyces euteiches*, *Botrytis cinerea*) al tulpinii P32, cât și capacitatea de protecție *in vivo* a plantelor de lucernă față de ciupercile fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, *Aphanomyces euteiches*) care produc căderea plantulelor.

Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii P32 a fost efectuată pe mediul cu cartof dextroză agar (PDA, Scharlau, Barcelona, Spania) față de *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873, *Fusarium graminearum* DSM4527, *Pythium ultimum* DSM 62987, *Sclerotinia sclerotiorum* DSM 1946, *Botrytis cinerea* DSM 5144, mediu V8 agarizat (suc V8 50 ml, 0,2 g CaCO₃, 20 g agar, pH 6,5) față de *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis* ATCC 42154 și mediu agarizat cu extract de porumb (cornmeal agar, Oxoid Thermo Scientific, Hampshire, Marea Britanie) față de *Aphanomyces euteiches* ATCC 08988. Tulpina P32 (dintr-o cultură de 24 h) a fost însămânțată pe mediu prin strierea cu ansă a unei linii drepte la o distanță de 3 cm de o rondea calibrată de miceliu (5 mm) din cele șapte ciuperci fitopatogene 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 h. Experiența a fost repetată de trei ori. Rezultatele, prezentate în tabelul 7, au demonstrat ca tulpina P32 produce metaboliți

RO 128930 B1

antifungici care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zona de inhibiție s-a înregistrat față de *Botrytis cinerea* (7 mm). Acțiunea biologică este semnificativă și față de *R. solani*, *P. ultimum*, *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, *S. sclerotiorum*, *A. euteiches* (5 mm). Bacteria prezintă un antagonism moderat și față de *F. graminearum* (2,5 mm).

Tabelul 7

Testarea in vitro a activității antagoniste a tulpinii de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm)*

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina P32
<i>Rhizoctonia solani</i> ATCC 66873	5
<i>Fusarium graminearum</i> DSM4527	2,5
<i>Pythium ultimum</i> DSM 62987	5
<i>Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis</i> ATCC 42154	5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> DSM 1946	5
<i>Botrytis cinerea</i> DSM 5144	7
<i>Aphanomyces euteiches</i> ATCC 08988	5

*media a 5 determinări

Tulpina P32 a fost testată în condiții controlate, în ceea ce privește eficacitatea în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, *Aphanomyces euteiches*) care produc căderea plantulelor. Pentru efectuarea testului s-au utilizat semințe de lucernă (*Medicago sativa*, ev. Magnat). Semințele 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). Ciupercile fitopatogene au fost crescute pe mediul Cartof-Glucoză-Agar (PDA, Scharlau) - *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873, *Fusarium graminearum* DSM4527, *Pythium ultimum* DSM 62987, *Sclerotinia sclerotiorum* DSM 1946, *Botrytis cinerea* DSM 5144, mediu V8 agarizat (suc V8 50 ml, 0,2 g CaCO₃, 20 g agar, pH 6,5) - *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis* ATCC 42154 și mediu cu extract de porumb (cornmeal agar, Oxoid) - *Aphanomyces euteiches* ATCC 08988 în scopul obținerii unei creșteri uniforme a miceliului. După incubare 4...5 zile la 28°C, miceliul a fost mărunțit și utilizat pentru inocularea a 200 ml mediu lichid similar (cartof glucoza pentru *R. solanii*, *F. graminearum*, *P. ultimum*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, mediu V8 lichid pentru *P. megasperma f. sp. medicaginis* și mediu cu extract de porumb pentru *A. euteiches*), distribuit în flacoane erlenmeyer. Flacoanele însămânțate au fost incubate timp de 4...5 zile la 28°C. Sporii au fost separați de miceliu prin filtrare, utilizând o pânză sterilă. Semințele de tomate bacterizate au fost semănate în pungi de material plastic sterile (cyg - Mega International, West St. Paul, MN, SUA) și plasate în camera de creștere, cameră climatică (Model SGC 120 LED, Weiss Gallenkamp, Loughborough, Marea Britanie) unde au fost menținute la 160 μmol fotoni/m²/s, cu o fotoperioadă de 12 h, la 21°C și 70% umiditate. Fiecare pungă a fost umectată cu 2 ml soluție nutritivă Hoagland, infectată cu spori în concentrație de 10⁶ spori/l soluție. În variantele martor netratat, pentru umectare s-a utilizat doar soluție

RO 128930 B1

nutritivă Hoagland. Semințele din varianta martor chimic au fost tratate cu Tachigaren 70 PU (Sumi-Agro România, București, România, himexazol 70%, doză echivalentă a 6 g/kg). Pungile au fost reumectate la fiecare 2 zile pe parcursul a 4 săptămâni, folosindu-se pentru reumectare soluții nutritive sterile.

După 4 săptămâni, plantele au fost analizate în privința simptomelor caracteristice fiecărei boli, cu precădere brunificarea coletului și a părții superioare a rădăcinilor. Eficacitatea a fost calculată cu ajutorul formulei Abbot:

$$\text{Eficacitatea \%} = (1 - \text{nPS}_i / \text{nPS}_t) * 100 \quad (1)$$

unde:

nPS_i este numărul de plante sănătoase la varianta martor infectat;

nPS_t este numărul de plante sănătoase la variantele tratate.

Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA). Eficacitatea tratamentului cu tulpina P32 de *P. mexicana* în combaterea bolilor complexului de răsărire la lucernă este prezentată în tabelul 8 de mai jos.

Tabelul 8

Eficacitatea tulpinii P32 în combaterea bolilor complexului de răsărire la plantele de lucernă (*Medicago sativa*) ev. *Madrigal*

Varianta tratament	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)
Inocul fungic	R.F.P*		R m.m.*		A.e.*	
Martor netratat, infectat	45	-	34	-	53	
Tachigaren 70 PU (4 g/kg)	93	87,27	98	96,97	94	87,23
P32	90	81,82	98	93,44	89	80,85

*R.F.P. - *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*; P.m.m. - *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*; A.e.-, *Aphanomyces euteiches*

În condițiile experimentale date, eficacitatea tulpinii P32 în protejarea plantelor de lucernă față de complexul de răsărire este comparabilă cu cea a produsului chimic folosit, fiind mai mare de 80% în toate cazurile.

În concluzie, tulpina testată prezintă o semnificativă acțiune de protecție a plantelor de lucernă față de ciupercile fitopatogene de sol.

Exemplul 6

S-a testat inocuitate tulpinii P32, folosind testul *Galleria mellonella*, unul dintre organismele model propuse pentru determinarea patogenității proteobacteriilor (**Seed și Dennis, 2008, Infect. Immun. 76:1267-1275**). Larvele au fost crescute pe substrat de cultură, la 30°C, substratul având următoarea compoziție: mălai 400 g, făină 200 g, tărâțe de grâu 200 g. Toate aceste componente s-au ținut în congelator timp de 7...10 zile, după care s-au sterilizat prin menținere la 70°C timp de 2 h. La aceste componente sterilizate, s-au adăugat 100 g drojdie uscată măcinată și 200 g lapte praf. La acest amestec pulverulent s-au adăugat 700 ml de amestec lichid, compus din 350 ml miere și 350 ml glicerină, în care s-a dizolvat ceară de albine (1:1). Compoziția finală s-a omogenizat la mixer și s-a păstrat în cutie de plastic, la 4°C.

RO 128930 B1

Larvele de vârstă a treia au fost păstrate la 4°C pe substratul menționat mai sus. Pentru infectare, s-a folosit o seringă Hamilton de 5 µl. S-au injectat câte 5 µl de suspensie bacteriană prin partea stângă a ultimului segment. După injectare, larvele au fost plasate în incubator, la întuneric, la 30°C, temperatura optimă pentru creșterea și dezvoltarea lor. Au fost realizate o serie de 10 diluții seriale, combinând concentrații bacteriene între 10⁶ și 0, în soluție 10 mM MgSO₄ + 1,2 mg/ml ampicilină, cu care s-au injectat larvele de *G. mellonella*. Larvele martor au fost injectate cu câte 5 µl soluție 10 mM MgSO₄ + 1,2 mg/ml ampicilină pentru a evalua orice potențial efect letal al procesului de injectare. Cu fiecare diluție s-au injectat câte 10 larve, fiind efectuate câte trei repetiții/diluție. Monitorizarea larvelor (moarte, vii) s-a făcut la 48...72 h după infecție, la 30°C (tabelul 12).

Tabelul 9

Mortalitate larvelor de *Galleria mellonella* injectate cu suspensii 10⁶ ufc/ml din tulpina de testat

Varianta	Repetiția	24 h post-infecție		48 h post-infecție		72 h post-infecție		
		vii	moarte	vii	moarte	vii	moarte	crisalide
Martor 10 mM MgSO ₄ + 1,2 mg/ml ampicilină (DO 0,000)	R1	20	0	20	0	20	0	2
	R2	20	0	20	0	19	1	1
	R3	20	0	19	0	18	1	-
P32 10 ⁶ ufc/ml	R1	20	0	19	1	18	2	-
	R2	18	2	18	2	18	2	-
	R3	20	0	20	0	19	1	1

Datele din tabelul 9 demonstrează faptul că tulpina testată, P32, nu prezintă practic patogenitate față de larvele de *Galleria mellonella*, neavând capacitatea de a se multiplica în corpul larvelor și de a produce bacteremii, deși au fost injectate în limfa larvelor într-o concentrație ridicată. Așadar, tulpina P32 nu este patogenă pentru metazoare și nu prezintă riscuri pentru sănătatea umană.

Exemplul 7

Tulpina *P. mexicana* P32 a fost multiplicată și inclusă într-o compoziție care să-i faciliteze colonizarea solului și/sau a rizosferei. Multiplicarea s-a realizat pe un mediu industrial OK (brevet RO 118717), care conține 10 g/l glicerină, 1,5 g/l autolizat de drojdie, K₂HPO₄ 1,0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g/l, CaCl₂ · 2H₂O 0,1 g/l. Mediu lichid a fost corectat la pH 6,5 cu NaOH 1 N, repartizat câte 150 ml în erlenmeyere de 1 l și agitat 150 rpm pe un agitator orbital (Unimax 1010, Heidolph Instrument) la 28°C, 48 h. După 48 h, s-a atins un nivel al populației bacteriene de 5,2 x 10⁹ ufc/ml. Această suspensie bacteriană a fost condiționată în granule, 35 ml de suspensie s-au adăugat peste 90 g de amestec format din 76 g făină integrală de ovăz, 10 g amestec care include esteri etilici ai acizilor grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină, lipide din ulei de rapiță, și 4 g alcool polivinilic (26...88, pulbere EMPROVE®, Merck, Darmstadt, Germania). Pasta rezultată a fost extrudată pe o mașină de făcut paste (Model TR95A, Helco, Craiova, România), iar tăiței rezultati au fost granulați pe un echipament de sferonizare (model Spheronis R-250m Grabler, Ettlingen, Germania). Granulele rezultate au fost uscate într-un uscător în pat fluid (Model TC20, Retsch, Germania), la o temperatură maximă de 40°C.

RO 128930 B1

Amestecul de esteri etilici ai acizilor grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină, și lipide nesaponificabile din ulei de rapiță s-a obținut conform procedurii descris în continuare. 1000 g de ulei degumat de rapiță, cu caracteristicile prezentate în tabelul 10, a fost adus într-o autoclavă de 2 l din oțel inoxidabil, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare de azot.

Tabelul 10

Caracteristicile uleiului degumat de rapiță folosit

Apă și compuși volatili	% m/m	0,4
Substanțe nesaponificabile	% m/m	1,4
Acizi grași liberi	% m/m	1,9
Index de saponificare	mg KOH/g	169,5
Compoziția medie în acizi grași (% m/m): C16: 2,4; C18: 1,2 ; C18-1: 16,1; C18-2: 24,5; C18-3: 7,3; C20-1: 7,3; C22-1: 42,4		

S-au dizolvat 25 g de hidroxid de potasiu de puritate 98% în 105 g de etanol cu 0,3% apă, iar soluția rezultată a fost adăugată în autoclav peste uleiul degumat de rapiță. Se pornește agitarea și încălzirea la 40°C. După un timp de reacție de 8 h, masa de reacție s-a răcit la temperatura camerei. S-au colectat 1225 g de masă transparentă de reacție (R1). 500 g de produs R1 s-a tratat cu acid oleic tehnic, obținându-se un produs cu următoarea compoziție (% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 74,5; trigliceride 5,9; glicerol 7,1; săpun de potasiu 11,4 și apă 1,1. 140 g din produsul de reacție (P1) a fost tratat prin agitare viguroasă cu 60 g emulsifiant lecitină de soia modificată, cu o balanță hidrofil - lipofilă HLB mai mare de 8 (Thermolec® WFC, Archer Daniels Midland, Decatur, IL, SUA), obținându-se un amestec cu următoarea compoziție (% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 48,7; grăsimi nereacționate din ulei de rapiță 4; glicerol 4,5; săpun de potasiu 7,5, lecitină 34,6 și apă 0,7. Acest amestec a fost cel din care s-au luat 10 g, care s-au folosit pentru obținerea compoziției cu eliberare controlată conținând tulpina P32.

Compoziția cu eliberare controlată pe baza tulpinii *P. mexicana* P32 astfel obținută este alcătuită din 76 părți făină integrală de ovăz, 4,8 părți esteri etilici ai acizilor grași, 4 părți alcool polivinilic, 3,5 părți lecitină, 0,75 părți săpun de potasiu, 0,45 părți glicerol, 0,4 părți grăsimi din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă, și minimum 10⁸ ufc/g *P. mexicana* P32.

Numărul de bacterii P32 în compoziția realizată a fost verificat folosind un indicator WST-1, conform metodei descrisă de **Johnsen et al., 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68:2683-2689.**

Exemplul 8

Tulpina P32 și compoziția cu eliberare controlată realizată în exemplul 7 au fost testate în privința capacității de degradare a benzpirenului contaminant în sol, folosind un experiment de tip microcosmos. Solul, cernoziom cambic de la Fundulea, a fost analizat în privința hidrocarburilor aromatice, fiind găsit ca liber de hidrocarburi aromatice. Solul utilizat avea o capacitate de reținere a apei (WHC) de 65% și un conținut de substanță organică de 3%. Solul a fost uscat, sitat printr-o sită de 1,18 mm și apoi repartizat, câte 6 g, în flacoane de sticlă brună de 50 ml. Solul din fiecare flacon a fost omogenizat cu o soluție de benzpiren (Sigma-Aldrich) dizolvat în acetonă, pentru a atinge o concentrație finală de 300 mg/kg sol.

RO 128930 B1

1 Un număr de 48 flacoane cu sol suplimentat cu benzpiren au fost utilizate într-un
2 experiment, randomizat în pătrat latin, în patru variante, fiecare cu câte patru repetiții
3 constituite din câte 3 flacoane. Cele 4 variante experimentale testate au fost:

4 V_1 - martor netratat;

5 V_2 - sol tratat cu 1 g/kg făină de orz integrală;

6 V_3 - sol tratat cu 1 ml suspensie 10^8 ufc/ml tulpină P32 per kg;

7 V_4 - sol tratat cu 1 g/kg compoziție conform exemplului 7.

8 Flacoanele au fost incubate 4 săptămâni la temperatura camerei, cu apă adăugată
9 săptămânal pentru a menține WHC la 65%. La sfârșitul celor 4 săptămâni, s-a determinat
10 numărul de bacterii care degradează hidrocarburi policiclice aromatice folosind indicator
11 WST-1, conform metodei descrise de **Johnsen et al, 2002, Appl. Environ. Microbiol.**
12 **68:2683-2689**, și cantitatea de benzpiren. Pentru determinarea benzpirenului, au fost extrase
13 2 g de sol cu 4 ml de n-hexan (Merck, Darmstadt, Germania), amestecat cu 1,5 ml de 15%
14 Triton X-100 (Sigma-Aldrich). După agitare la 200 rpm pentru 24 h, probele au fost stocate
15 la -20°C pentru 24 h. Stratul hexanic a fost apoi prelevat cu o pipetă Pasteur, deshidratat cu
16 Na_2SO_4 anhidru (Merck) și filtrat printr-un filtru PTFE. Concentrația de benzpiren a fost deter-
17 minată gaz-cromatografic, pe un cromatograf Perkin Elmer Clarus 500 (Perkin Elmer,
18 Waltham, MA, SUA), cu detector de ionizare în flacără, după separare pe o coloană capilară
19 30 m x 0,32 mm diametru intern x 0,25 μm grosime strat cu 5% fenil-metil siloxan. Procentul
20 de benzpiren rămas a fost calculat cu următoarea formulă:

$$21 \quad (100 - (C_M - C_T)C_M) \times 10 \quad (2)$$

22 în care:

23 C_M este concentrația în proba martor netratat;

24 C_T este concentrația în variantele tratate.

25 Datele s-au prelucrat prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft). Rezultatele sunt
26 prezentate în tabelul 11 de mai jos. Aceste rezultate susțin eficacitatea tulpinii P32 pentru
27 bioremedierea solului contaminat cu benzpiren.

28 *Tabelul 11*

29 *Influența tulpinii P32 și a compoziției pe baza acesteia asupra degradării benzpirenului*
30 *din sol într-un experiment de tip microcosmos*

31 Varianta experimentală	32 Procentul din benzpirenul rămas*	33 Număr bacterii care degradează hidrocarburi aromatice policiclice (log ufc/g sol uscat)
34 V_1 - martor netratat	93,55 ± 4,85	0
35 V_2 - sol tratat cu 1 g/kg făină de orz integrală	77,47 ± 9,82	6,15 ± 0,68
36 V_3 - sol tratat cu 1 ml suspensie 10^8 ufc/ml tulpină P32 per kg	34,15 ± 7,54	7,85 ± 0,22
37 V_4 - sol tratat cu 1 g/kg compoziție conform exemplului 7	5,2 ± 2,3	9,66 ± 0,27

38 *concentrația inițială a fost de 300 mg/kg sol

39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Exemplul 9

Tulpina P32 și compoziția cu eliberare controlată realizată în exemplul 7 au fost testate în privința capacității de a susține fitorizoremedierea unui sol contaminat cu hidrocarburi totale din petrol. Solul, cernoziom cambic de la Fundulea, cu caracteristici similare cu cele descrise în exemplul 8, a fost contaminat cu petrol brut provenind de la o sondă de lângă Câmpina (Petrom, București, România). 40 g de petrol brut au fost amestecate cu câte 2 kg de sol, amestecul fiind agitat pentru 2 min într-un container de plastic închis ermetic. După omogenizare, solul contaminat cu petrol a fost transferat în ghivece de plastic de 15 cm diametru și a fost însămânțat cu semințe de lucernă (*Medicago sativa*, ev. Magnat). Au fost menținute și ghivece cu sol neînsămânțat.

Un număr de 80 ghivece au fost utilizate pentru a realiza un experiment, în 5 variante, fiecare cu câte 4 repetiții constituite din câte 4 flacoane. Cele 5 variante experimentale testate au fost:

V₁ - martor sol netratat

V₂ - sol însămânțat cu lucernă

V₃ - sol însămânțat cu lucernă, tratat cu echivalentul a 100 g/m² făină de orz integrală;

V₄ - sol însămânțat cu lucernă tratat cu echivalentul a 100 ml suspensie 10⁸ ufc/ml tulpină P32 per m²;

V₅ - sol însămânțat cu lucernă tratat cu echivalentul a 100 g/m² compoziție conform exemplului 7.

Ghivecele au fost menținute în condiții de seră, la 26 ± 3°C, cu o fotoperioadă de 16 h, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 μE/m²/s, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub 500 μE/m²/s. Plantele au fost crescute șase luni, la o umiditate relativă, care a variat între 55 și 85%. După șase luni, s-au prelevat, experimentul a fost desființat, rădăcinile plantelor de lucernă au fost curățate de sol și apoi s-au cântărit plantele în totalitate. S-a realizat determinarea conținutului de hidrocarburi totale prin metoda EPA 418,1, adaptată, în probe de câte 5 g sol. Proba de sol cântărită exact a fost introdusă într-un cartuș de extracție și extrasă cu 100 ml clorură de metilen în zece cicluri într-un aparat Soxhlet. Pentru analiza IR, un volum exact măsurat de clorură de metilen, cuprins între 1,5...2 ml, a fost transferat în flacon de evaporare și adus la sec la nișă sub flux de azot. Reziduul s-a reluat cantitativ în 10 ml diclorodifluormetan (Fisher Scientific, Schwerte, Germania) și s-a adăugat 1 g de silicagel (Sigma-Aldrich) pentru îndepărtarea compușilor polari. Conținutul în hidrocarburi totale din petrol (HTP) s-a determinat folosind un analizor IR de hidrocarburi totale (Model HC-404, Buck Scientific, East Norwalk, CT, SUA).

Valoare absorbantei a fost transformată în concentrații HTP pe baza unei curbe etalon, realizate cu diluții între 10 mg/kg și 1000 mg/kg din material de referință (HC-404 reference standard, Buck Scientific).

În probele de sol s-a determinat numărul de bacterii care degradează hidrocarburile policiclice aromatice folosind indicator WST-1, conform metodei descrise de **Johnsen et al., 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68:2683-2689**.

Datele s-au prelucrat prin analiza variantei (Statistica 10). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 12 de mai jos. Aceste rezultate susțin eficacitatea tulpinii P32, și a compoziției pe baza acesteia, asociate plantelor de lucernă, pentru fitorizoremedierea solului contaminat cu hidrocarburi totale din petrol.

Influența tulpinii P32 și a compoziției pe baza acesteia asociate plantelor de lucernă,
 pentru fitorizomediarea solului contaminat cu hidrocarburi totale din petrol
 în condiții de seră

Varianta experimentală	Concentrația medie HTC* (mg/kg sol)	Număr bacterii care degradează hidrocarburi aromatice policiclice (log ufc/g sol uscat)	Masa medie a plantelor de lucernă g/plantă
V ₁ - martor sol netratat	9450 a	4,24 ± 0,54 c	-
V ₂ - sol însămânțat cu lucernă	8270 b	4,65 ± 0,86 c	9,5 d
V ₃ - sol însămânțat cu lucernă, tratat cu echiv. 100 g/m ² făină de orz integrală	7420 c	5,05 ± 0,78b c	10,1 c
V ₄ - sol însămânțat cu lucernă, tratat cu echiv. 100 ml suspensie 10 ⁸ ufc/ml tulpină P32 per m ²	6850 d	5,45 ± 0,37 b	10,7 b
V ₅ - sol însămânțat cu lucernă, tratat cu echiv 100 g/m ² compoziție conform exemplului 7	6170 e	6,39 + 0,42 a	11,2 a

* Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P > 0,05; concentrația inițială a fost de 20 g hidrocarburi totale din petrol (HTC)/kg sol

Includerea tulpinii P32 în compoziția realizată conform invenției crește capacitatea tulpinii de a coloniza rizosfera plantelor de lucernă și de a fitorizomedia împreună cu acestea solul contaminat cu hidrocarburile totale din petrol.

1. Tulpină de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 NCAIM (P) B 001414, **caracterizată prin aceea că** prezintă antagonism *in vitro* față de ciupercile fitopatogene de sol, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, *Aphanomyces euteiches*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, protejează plantele de lucernă față de ciupercile fitopatogene de sol, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, *Aphanomyces euteiches*, care produc căderea plantulelor, și manifestă inocuitate în testul pe *Galleria mellonella*, nefiind patogenă pentru metazoare.

2. Compoziție cu eliberare controlată pe baza tulpinii *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 NCAIM (P) B 001414, **caracterizată prin aceea că**, este alcătuită din: 76 părți făină integrală de ovăz, 4,8 părți esteri etilici ai acizilor grași, 4 părți alcool polivinilic, 3,5 părți lecitină, 0,75 părți săpun de potasiu, 0,45 părți glicerol, 0,4 părți grăsimi din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă, și minimum 10^8 ufc/g *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 NCAIM (P) B 001414.

