



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **03.12.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.10.2013 BOPI nr. **10/2013**

(71) Solicitant:
• **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,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **RĂUȚ IULIANA**,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚEI, 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 BÂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **TULPINĂ DE PSEUDOXANTHOMONAS MEXICANĂ ȘI
COMPOZIȚIE CU ELIBERARE CONTROLATĂ CARE
CONȚINE RESPECTIVA TULPINĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o tulpină de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 NCAIM (P) B 001414, și la o compoziție cu eliberare controlată pe baza acesteia, utilizată pentru remedierea solurilor poluate. Tulpina conform invenției are capacitatea de a degrada hidrocarburi alifatiche și aromatice, prezintă antagonism *in vitro* față de ciupercile fitopatogene din sol, stimulează germinației lucernei și dezvoltarea plantulelor de lucernă în condiții

controlate. Compoziția conform invenției este alcătuită din făină integrală de ovăz, esteri etilici ai acizilor grași, alcool polivinilic, lecitină, săpun de potasiu, glicerol, trigliceride din ulei de rapiță, apă și minimum 10⁸ ufc/g *P. mexicana* P32.

Revendicări: 2



TULPINĂ DE *PSEUDOXANTHOMONAS MEXICANA* ȘI COMPOZIȚIE CU ELIBERARE CONTROLATĂ CARE CONȚINE RESPECTIVA TULPINĂ

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

Sunt cunoscute tulpini de microorganisme, în special bacterii din filumul Proteobacteria, care degradează hidrocarburi aromatice și alifaticе, ca și derivați ai acestora, din solurile poluate. Brevetul US 5543317 se referă la o tulpină de *Pseudomonas cepacia* (specie ulterior reclasificată ca *Burkholderia cepacia*) PR₁₂₃, inițial denumită G4 5223 Phe, depozitată sub numărul NRRL B-18811, care are capacitatea de a degrada produse chimice periculoase din categoria derivaților clorurați ai alcanilor, tricloretilenă, 1,1 – diclorețan, cis-1-2-dicloretilenă, cis-1-2-dicloretilenă, și hidrocarburi aromatice, p-toluen, fenol, o-cresol, m-cresol, o-xilen și benzen. Cerea de brevet KR20030066948 protejează o tulpină de *Burkholderia cepacia* 2A-12, depozită sub numărul KCTC 10163BP, cu capacitatea ridicată de a degrada hidrocarburile policiclice aromatice, și un procedeu de bioremediere care implică stropirea zonei contaminate cu respectiva tulpină și cu un extract de drojdie. Cererea de brevet CN102250788 (A) descrie o tulpină de *Stenotrophomonas maltophilia* depozitată sub numărul CGMCC 4839, cu capacitate ridicată de a utiliza metilbenzenul / toluenul ca unică sursă de carbon și energie, și de a degrada și tolera toluenul.

Cele două specii de proteobacterii menționate mai sus, *Burkholderia cepacia* și *Stenotrophomonas maltophilia*, sunt specii cu o mare versatilitate ecobiotehnologică, care degradează compuși organici poluanți, inclusiv hidrocarburi și derivați ai acestora, au activitatea antagonistă față de fitopatogeni și de biostimulare a plantelor, biosintetizează compuși utili, inclusiv antibiotice – a vedea de exemplu trecerile în revistă Mahenthiralingam *et al.*, 2008, J. Appl. Microbiol. 104:1539–1551 pentru *B. cepacia* sau Ryan *et al.* 2009, Nat. Rev. Microbiol 7: 514–525 pentru *S. maltophilia*. Aceste specii sunt însă și patogeni

oportuniști umani, cu mare rezistență la antibiotice, care produc infecții intra-hospitalicești grave (a se vedea de ex. trecerile în revistă Govan și Deretic, 1996. Microbiol. Rev. 60:539-574 pentru *B. cepacia* sau Looney, 2009 Lancet Infect. Dis. 9: 312–323 pentru *S. maltophilia*). Din acest motiv folosirea lor în aplicații de bio- sau fitorizoremediere implică riscuri pentru sănătatea umană.

Brevetul JP3618785 dezvăluie un procedeu prin care bioremedierea se realizează cu celule lizate de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, tulpina KK01, depozitată ca FERM-BP-4235. Se înlătură astfel riscurile ulterioare pentru sănătatea umană, dar un astfel de procedeu implică folosirea unei cantități foarte mari de lizat de celule, care să furnizeze enzimele necesare decontaminării, și nu mai oferă avantajul folosirii unei cantități (relativ) mici de microorganisme din tulpina cu eficiență ridicată în biodegradarea poluanților organici, ca inoculant care să colonizeze ulterior nișa ecologică, inclusiv rizosfera plantelor. Lizatul de celule nu este util în procesele de fito(rizo)remediare, în care degradarea compușilor organici se realizează prin acțiunea combinată a rădăcinilor plantelor (și a compușilor exudați de rădăcini) și a tulpinilor de microorganisme care se dezvoltă în rizosferă, co-metabolizând exsudatele plantelor și compuși organici poluanți, și susținând dezvoltarea plantelor (pentru descrierea proceselor și a mecanismelor implicate a se vedea de ex. trecerile în revistă Kuiper *et al.* 2004. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:6–15; Lugtenberg și Kamilova, 2009. Annu. Rev. Microbiol. 63:541-556.)

Este necesară identificarea unor tulpini de proteobacterii cu o versatilitate ecobiotehnologică 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 RU2406758 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)remediare. Pentru această tulpină nu au fost însă descrise caracteristici de antagonism pentru agenții fitopatogeni, deci această tulpină numai 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 alifatice 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*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aphanomyces euteiches*, *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 min. 10^8 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 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 granulelor de compoziție cu eliberare controlată;
- stimularea și protecția culturii de lucernă folosite împreună cu tulpina de *P. mexicana* P32 pentru fitorizoremediere, cu reducerea costurilor de întreținere a culturii și a eficienței procesului de fitorizoremediere;
- asigurarea unei supraviețuirii de lungă durată a formelor inactive metabolic de proteobacterii *P. mexicana* P32 în compoziția cu eliberare controlată, datorită menținerii unei activități optime a apei în substrat, sub acțiunea umectantă a glicerinei și repelentă a compușilor hidrofobi;
- asigurarea unei colonizări uniforme și reproductibile de către tulpina P32 a solului în cazul utilizării compoziției cu eliberare controlată, propagule fiind eliberate treptat din compoziția conform prezentei invenții, și protejate de acțiunea toxică a hidrocarburilor, în perioada critică de reactivare a formelor inactive metabolic, ca urmare a acumulării preponderente a hidrocarburilor în componenta hidrofobă a compoziției.

În continuare invenția va fi descrisă în detaliu în următoarele exemple.

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

Probele de sol prelevate din zone poluate cu petrol au fost aduse la o granulație mai mică de 0,2 mm prin sitare și inoculate pe un mediu minimal steril, suplimentat cu 50 mg/l fenantren. S-a menținut la 32°C pe un agitator orbital

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

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

Tab. 1. Morfologia coloniilor și celulelor de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 pe mediu LB agarizat după cultivare timp de 24 ore.

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

Tab. 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii P32.

Testul biochimic	P32
Reacția Gram	-
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Urează	-
Reducerea $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$	-
Creștere anaeroba	-
Oxidază	+
Catalaza	+
Lecitinază	-
Sursa de carbon:	
gentiobioză	-
galactoză	-
zaharoza	+
maltoza	-
glucoza	-
xiloza	+
manoza	+
fructoza	-
trehaloză	-
sorbitol	+
manitol	+
inozitol	-
glicerol	+
meso-eritritol	+
D/L prolină	+
adipat	-
fenilacetat	+
malat	+

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

Compoziția în acizi grași celulari fost determinată folosind un sistem automat GC Sherlock Microbial Identification System (MIDI, Newark, SUA) și procedura standard MIDI (Sasser, 1990, în *Methods in Phytobacteriology*, pp. 119–204. Z. Klement, K. Rudolph și D. C. Sands eds., Budapest: Akademiai Kiado). Acizi 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, corespunzând

profilului de acizi grași celulari specific speciei *Pseudoxanthomonas mexicana* (Thierry *et al.*, 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2245-2255).

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; 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). Secvența parțială de 527 perechi baze a prezentat o similaritate de 100% cu secvența tulpinii de referință AMX 26B^T / ATCC 700993^T (Thierry *et al.*, 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2245-2255).

Exemplul 2. S-a testat abilitatea diferitelor izolate de a crește pe un mediu lichid minimal suplimentat cu diferiți compuși xenobiotici, ca singură sursă de carbon și energie. A fost folosit același mediu minimal ca în ex.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 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 (hidrocarburi aromatice policiclice), carbazol, fenol, motorină și ulei mineral (alte produse petroliere). Mediul minimal suplimentat cu xenobiotice a fost repartizat aseptice în plăci de 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 de 72 ore. După 72 ore în plăcile de microtitrare s-a determinat densitatea optimă folosind un cititor de plăci multimod PolStar Optima (BMG Labtech, Oretenberg, Germania). Dintre toate 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 utilizarea

diferiților compuși xenobiotici ca singură sursă de carbon și energie este prezentată în tabelul 3.

Tab. 3. 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	+++
n-hexan	++
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 violosceină, 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 astfel nu poate fi activată enzima β-

galactozidază. 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 verzuie-albăstruie 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 înprospătate pe mediul agarizat Luria-Bertani (10g bacto-triptonă; 5g extract de drojdii; 10g NaCl; 20g agar-agar; pH 7.2, sterilizat 20 minute la 121°C) cu 24 de ore 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).

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 distanță de 3 mm fata de tulpina martor. Plăcile s-au incubat la 28°C și au fost analizate la 24 ore. Apariția culorii violet în zona de creștere a tulpinii Cv026, respectiv a culorii verzi în zona de creștere a tulpinii NT1, a indicat prezența moleculelor de acil-homoserin-lactonă produse de tulpina P32. Testul a fost repetat de trei ori, cu ambele tulpini biosenzor. De fiecare dată s-a evidențiat apariția culorii specifice diferitelor tulpini biosenzor, fapt care demonstrează producerea de către tulpina P32 de molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei acil între C₄ și C₁₂.

Capacitatea de formare de biofilme *in vitro* a fost analizată prin metoda spectrofotometrică. Bacteriile P32 au fost crescute pe mediu lichid LB, la 28°C, până la atingerea unei densități optice OD₆₀₀=2.0. Aceste culturi s-au transferat apoi aseptice pe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri, cu 8 repetiții din fiecare tip de tulpină testată.

Plăcile s-au incubat la 25°C pentru 24 de ore. Turbiditatea celulelor se determină folosind un cititor de plăci multimod PolStar Optima (BMG Labtech).. După perioada de incubare de 24 de ore, mediul lichid s-a spălat de 3 ori cu apă sterilă pentru a se îndepărta bacteriile slab asociate. Plăcile s-au uscat la temperatura camerei timp de 45 de minute, după care s-a colorat fiecare godeu cu o soluție de 0,1% de verde malachit timp de 20 de minute. S-a spălat colorantul

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 verdelui malachit cu reader de plăci de microtitrare la 620 nm. Rezultatele obținute pentru diferite tulpini testate sunt prezentate în tab. 4, comparativ pentru tulpina P32 și pentru alte izolate testate. Se remarcă faptul că tulpina P32 produce o cantitate semnificativă de biofilm *in vitro*.

Tab. 4. Valorile absorbanței 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
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
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
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
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
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
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
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
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
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

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 (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 $DO_{600} = 2.0$. S-au spălat și s-au resuspendat în același mediu. S-a incubat la 28°C. După 48 ore s-au prelevat aseptice 0,1 ml de amestec nisip - mediu de cultură, s-au adus într-un tub de 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 apoi 0,15 ml soluție 10mM $MgSO_4$ în toate tuburile și s-a vortexat. Din supernatantul în care s-au reluat bacteriile s-a determinat numărul de ufc prin tehnica diluțiilor.

Tulpina P32 de *Pseudoxanthomonas mexicana* a fost comparată din punct de vedere al capacității de formare biofilme cu tulpina HRO-C48 (= DSMZ12502) de *Serratia plymuthica*, 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* cv. 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 ore, 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 10mM $MgSO_4$ și s-a vortexat pentru 5 minute. Supernatantul s-a reluat prin sucțiune, iar rădăcinuța a extrasă din tubul de centrifugă și fost 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 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 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 germinației 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 e microorganismele atunci când sunt crescute într-un mediu de cultură conținând glucoză sau alte surse de carbon degradabile pe calea Embden - Meyerhof. Formarea acetoinii 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 ore în LB (incubată la 28°C cu agitare), apoi 100μl cultură au fost inoculați în 5ml mediu lichid cu glucoză (protezo – peptonă 7g, glucoză 5g, NaCl 5 g, apă distilată până la 1000ml), distribuit în eprubete, sterilizat 15 minute 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 și, ulterior, adăugarea în fiecare eprubetă a 1 mg de creatină, mixtura fiind agitată viguros. Apariția culorii roșii, după 30-60 minute, la temperatura camerei, a indicat prezența acetil-metil-carbinolului, deci o reacție pozitivă, ceea ce arată capacitatea bacteriilor P32 de a produce compuși volatili care stimulează creșterea plantelor.

Intr-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 mineral s-a utilizat mediul agarizat Pikovskaya, care conține (per litru): 0,5 g extract drojdie, 10 g glucoză, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 0,5 g (NH₄)₂SO₄, 0,2 g KCl, 0,1 g MgSO₄·7H₂O, 0,0001 g MnSO₄·H₂O, 0,0001 g FeSO₄·7H₂O și 15 g agar. Pe acest mediu bacteriile tulpinii P32 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 CaCl₂, 5 g NH₄NO₃, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 0,01 g FeSO₄·7H₂O, 0,01 g MnSO₄·H₂O, 15 g agar. Si pe acest mediu bacteriile tulpinii P32 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat și fosforul organic din fitați.

Activitatea de stimulare a creșterii plantelor a tulpinii P32 a fost pusă în evidență prin efectuarea de experimente în condiții controlate, folosind plantule de lucernă, *Medicago sativa*, cv. Magnat. În vederea inoculării, semințele de lucernă

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 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 rpm timp de 16 ore. Inocularea semințelor s-a realizat la două concentrații, de 10⁶ sau 10⁸ ufc/ml. Bacterizarea semințelor 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 semințe de lucernă, sterilizate ca mai sus și imersate în apă distilată sterilă.

Semințele de lucernă 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 semințe/placă, în 5 repetiții. Fiecare variantă a constat în 100 semințe. 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 P32 asupra dezvoltării plantulelor de grâu, semințele de lucernă 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 semințe per variantă). Peste apa agarizată au fost adăugați câte 5 ml de mediu mineral nutritiv pentru plante cu formula: 0,4 g NH₄H₂PO₄; 2,4 g KNO₃; 1,6 g Ca(NO₃)₂; 0,8 g MgSO₄, 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 lucernă după 72 de ore, determinându-se lungimea rădăcinuței și înălțimea plantulei.

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

Tab. 5. Influența inoculului bacterian cu tulpina P32 asupra capacității de germinare a semințelor de lucernă. (*Medicago sativa* cv. 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

Tab. 6. Testarea efectului de stimulare a creșterii plantelor de lucernă. (*Medicago sativa* cv. Magnat) de către tulpina P32 (72 ore 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
		DL 5%		0,38	0,27

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, ca 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 dextroza 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 (cormmeal agar, Oxoid Thermo Scientific, Hampshire, Marea Britanie) față de *Aphanomyces euteiches* ATCC 08988. Tulpina P32 (dintr-o cultura de 24 ore) a 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 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 ore. Experiența a fost repetată de trei ori. Rezultatele, prezentate în tabelul 7, au demonstrat că tulpina P32 produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă 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).

Tab. 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</i> f. sp. <i>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*), cv. Magnat. Semințele dezinfectate în prealabil cu soluție 4% hipoclorit, au fost imersate într-un amestec constând din suspensie celulară bacteriană cu titrul de 1

x 10⁹ 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 (cormmeal 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 glucoză 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 pungă 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 ore, la 21°C și 70% umiditate. Fiecare pungă a fost umețată cu 2 ml soluție nutritivă Hoagland, infectată cu spori în concentrație de 10⁶ spori/litru soluție. În variantele martor netratat pentru umețare s-a utilizat doar soluție nutritivă Hoagland. Semințele din varianta martor chimic au fost tratate cu Tachigaren 70 PU (Sumi-Agro Romania, București, România, himexazol 70%, doză echivalentă a 6 g/kg). Pungile au fost reumețate la fiecare 2 zile pe parcursul a 4 săptămâni, folosindu-se pentru reumețare 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:

$$\text{Eficacitatea \%} = (1 - nPS_i/nPS_j) * 100 \quad (1)$$

Unde:

nPS_i este numărul de plante sănătoase la varianta martor infectat;

nPS_j este numărul de plante sănătoase la variantele tratate.

Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței (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.

Tab. 8. Eficacitatea tulpinii P32 în combaterea bolilor complexului de răsărire la plantele de lucernă (*Medicago sativa*) cv. Madrigal.

Varianta tratament	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)
<i>Inocul fungic</i>	<i>R.F.P.*</i>		<i>P. m.m.*</i>		<i>A.e.*</i>	
Martor netratat, infectat	45	-	34	-	53	
Tachigaren 70 PU (4g/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 propus 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 70°C timp de 2 ore. La aceste componente sterilizate, s-a adăugat drojdie uscată măcinată 100 g și lapte praf 200 g. 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.

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 10^6 și 0, în soluție 10 mM $MgSO_4$ + 1.2 mg/ml ampicilina, cu care s-au injectat larvele de *G. mellonella*. Larvele martor au fost injectate cu câte 5 μ l soluție 10 mM $MgSO_4$ + 1.2 mg/ml ampicilina pentru a evalua orice potențial efect letal al procesului de injectare. Din fiecare diluție s-au injectat câte 10 larve, fiind efectuate câte trei repetiții/ diluție. Monitorizarea larvelor (moarte, vii) s-a făcut la 48-72 ore după infecție, la 30°C (tab. 12).

Tab. 9. Mortalitate larvelor de *Galleria mellonella* injectate cu suspensii 10^6 ufc/ml din tulpina de testat.

Varianta	Repetiția	24 ore post-infecție		48 ore post-infecție		72 ore post-infecție		
		vii	moarte	vii	moarte	vii	moarte	crisalide
Martor 10 mM $MgSO_4$ + 1.2 mg/ml ampicilina (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 tab. 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. Deci 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, K_2HPO_4 1.0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 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 ore. După 48 ore s-a atins un nivel al populației bacteriene de $5,2 \times 10^9$ 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 rezultați 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.

Amestecul de esteri etilici ai acizilor grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină, 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 litri din oțel inox, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare de azot.

Tab. 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 ore, 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 compoziția 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 10g și 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 min. 10^8 ufc/g *P. mexicana* P32.

Numărul de bacterii P32 în compoziția realizată a fost verificat folosind 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 ex. 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 prin 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.

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

V₁ – martor netratat;

V₂ – sol tratat cu 1g/kg făină de orz integrală;

V₃ – sol tratat cu 1 ml suspensie 10^8 ufc/ml tulpină P32 per kg;

V₄ – sol tratat cu 1 g/kg compoziție conform ex.7

Flacoanele au fost incubate 4 săptămâni la temperatura camerei, cu apă adăugată săptămânal pentru a menține WHC la 65%. La sfârșitul celor 4 săptămâni s-a determinat numărul de bacterii care degradează hidrocarburi policiclice aromatice folosind indicator WST-1, conform metodei descrisă de Johnsen *et al.*, 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68:2683–2689, și cantitatea de benzpiren. Pentru determinarea benzpirenului au fost extrase 2 g de sol cu 4 ml

de n-hexan (Merck, Darmstadt, Germania), amestecat cu 1,5 ml de 15% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). După agitare la 200 rpm pentru 24 ore, probele au fost stocate la -20°C pentru 24 ore. Apoi stratul hexanic a fost prelevat cu o pipetă Pasteur, deshidratat cu Na₂SO₄ anhidru (Merck) și filtrat printr-un filtru PTFE. Concentrația de benzpiren a fost determinată gaz-cromatografic, pe un cromatograf Perkin Elmer Clarus 500 (Perkin Elmer, Waltham, MA, SUA), cu detector de ionizare în flacără, după separare pe o coloană capilară 30 m × 0,32 mm diametru intern × 0,25 μm grosime strat cu 5% fenil-metil siloxan. Procentul de benzpiren rămas a fost calculat cu următoarea formulă:

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

în care:

C_M este concentrația în proba martor netratat;

C_T este concentrația în variantele tratate

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

Tab. 11. Influența tulpinii P32 și a compoziției pe baza acesteia asupra degradării benzpirenului din sol într-un experiment de tip microcosmos.

Varianta experimentală	Procentul din benzpirenul rămas*	Număr bacterii care degradează hidrocarburi aromatice policiclice (log ufc/g sol uscat)
V ₁ – martor netratat	93,55±4,85	0
V ₂ – sol tratat cu 1g/kg făină de orz integrală	77,47±9,82	6,15±0,68
V ₃ – sol tratat cu 1 ml suspensie 10 ⁸ ufc/ml tulpină P32 per kg	34,15±7,54	7,85±0,22
V ₄ – sol tratat cu 1 g/kg compoziție conform ex.7	5,2±2,3	9,66±0,27

*concentrația inițială a fost de 300 mg/kg sol

Includerea tulpinii P32 în compoziția realizată conform invenției crește capacitatea tulpinii de a coloniza solul și de a degrada hidrocarburi aromatice policiclice.

Exemplul 9. Tulpina P32 și compoziția cu eliberare controlată realizată în ex. 7 au fost testate în privința capacității de a susține fitoremedierea unui sol contaminat cu hidrocarburi totale din petrol. Solul, cernoziom cambic de la

Fundulea, cu caracteristici similare cu cele descrise în ex.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*, cv. Magnat). Au fost menținute și ghivece cu sol neînsămânțat

Un număr de 80 ghivece au fost utilizate pentru a realiza un experiment, în cinci variante, fiecare cu câte patru 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 echiv. 100g/m² făină de orz integrală;

V₄ – sol însămânțat cu lucernă tratat cu echiv. 100 ml suspensie 10⁸ ufc/ml tulpină P32 per m²;

V₅ – sol însămânțat cu lucernă tratat cu echiv. 100 g/m² compoziție conform ex.7.

Ghivecele au fost menținute în condiții de seră, la 26±3°C, cu o fotoperioadă de 16 ore, 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 cântă plantele în totalitate. În probe de câte 5 g sol în care s-a realizat determinarea conținutului de hidrocarburi totale prin metoda EPA 418.1, adaptată. 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 diclordifluorometan (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 absorbanței a fost transformată în concentrații HTP pe baza unei curbe etalon realizate cu diluții între 10 mg/kg și 1000mg/kg din material de referință (HC-404 reference standard, Buck Scientific).

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

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

Tab. 12. 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	9450a	4,24±0,54c	-
V ₂ - sol însămânțat cu lucernă	8270b	4,65±0,86c	9,5d
V ₃ – sol însămânțat cu lucernă, tratat cu echiv. 100g/m ² făină de orz integrală	7420c	5,05±0,78bc	10,1c
V ₄ – sol însămânțat cu lucernă tratat cu echiv. 100 ml suspensie 10 ⁸ ufc/ml tulpină P32 per m ²	6850d	5,45±0,37b	10,7b
V ₅ – sol însămânțat cu lucernă tratat cu echiv. 100 g/m ² compoziție conform ex.7.	6170e	6,39±0,42a	11,2a

* Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05; concentrația inițială a fost de 20g 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.

REVENDICARI

1. Tulpină de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 NCAIM (P) B 001414 **caracterizată prin aceea că** prezintă caracteristici superioare de degradare a hidrocarburilor aromatice și alifatică în diferite medii, inclusiv sol, și inclusiv în combinație cu rădăcinile plantei de lucernă; produce biofilme *in vitro* și *in situ*; biosintetizează compuși volatili cu acțiune de stimulare a creșterii plantelor și solubilizează fosforul din formele sale insolubile, organice și anorganice; stimulează germinația lucernei și dezvoltarea plantulelor de lucernă în condiții controlate; prezintă antagonism *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*; 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; manifestă inocuitate în testul pe *Galleria mellonella*, nefiind patogenă pentru metazoare.

2. Compoziție cu eliberare controlată pe baza tulpinii *P. mexicana* P32 **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 min. 10^8 ufc/g *P. mexicana* P32.