



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00141**

(22) Data de depozit: **11.02.2013**

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

(71) Solicitant:
• **EURO BIO S.R.L., STR. GORUNULUI
NR. 7, OTOPENI, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR. 5,
BL. D 7, SC. E, ET. 2, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PAIRAULT ADRIANA LILIANA,
STR. PETRU RAREȘ NR. 14, VOLUNTARI
PIPERA, IF, 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 *BREVIBACILLUS PARABREVIS* ȘI
COMPOZIȚIE CU ELIBERARE CONTROLATĂ PE BAZĂ
DE ACEASTA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o tulpină de *Brevibacillus parabrevis* B50 și la o compoziție cu eliberare controlată, pe baza acesteia, utilizată pentru protecția și nutriția plantelor. Tulpina conform invenției prezintă antagonism *in vitro* față de agenți patogeni din sol, are capacitatea de a favoriza dezvoltarea simbiozelor micorizale pe rădăcinile plantelor, și asigură protecția plantelor de porumb și a unor plante ornamentale

împotriva agenților patogeni din sol. Compoziția conform invenției este alcătuită din făină integrală de ovăz, esteri metilici ai acizilor grași, alcool polivinilic, lecitină, săpun de potasiu, glicerol, ulei de rapiță, apă și minimum 10^8 ufc/g *B. parabrevis* B50.

Revendicări: 2



TULPINĂ DE *BREVIBACILLUS PRABREVIS* ȘI COMPOZIȚIE CU ELIBERARE CONTROLATĂ PE BAZA DE ACEASTA

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Brevibacillus parabrevis*, care prezintă antagonism față de agenții fitopatogeni din sol și capacitate de a favoriza dezvoltarea simbiozelor micorizale pe rădăcinile plantelor, ca și la o compoziție cu eliberare controlată care conține această tulpină, destinată formării unor composturi supresive complexe, care includ și spori de micoriză, composturi utilizabile pentru protecția și nutriția plantelor, în special a celor ornamentale.

Sunt cunoscute o serie întreagă de tulpini de bacterii gram-pozitive endosporulante, aparținând genului *Brevibacillus*, care sunt destinate utilizării în agricultură. Brevetul RU2422511 (C1) descrie tulpina 16-336 de *Brevibacillus laterosporus*, depozitată cu numărul B-10531 la Colecția Națională Rusă de Microorganisme Industriale, care produce un spectru larg de compuși biologic activi, inhibând creșterea algelor dăunătoare și a ciupercilor microscopice fitopatogene. Cererea de brevet WO2010142055 (A3) se referă la o compoziție cu un larg spectru de acțiune față de bacterii fitopatogene și ciupercile microscopice producătoare de mană, realizată pe baza unui consorțiu de bacterii gram-pozitive sporulante, care include și tulpini de *Brevibacillus parabrevis*. Brevetul SUA 5055293 (A) protejează tulpina P5 de *Brevibacillus laterosporus* (nr de depozit ATCC 53694), care este patogenă pentru de o serie întreagă de lepidoptere dăunătoare culturilor agricole, și în special față viermele vestic al porumbului (*Diabrotica virgifera virgifera*). Tulpina P5 se aplică ca tratament la sol sau al seminței pentru limitarea populațiilor lepidopterelor dăunătoare față de care este activă. Cererea de brevet RO 127467 (A2) prezintă o tulpină nouă de *Brevibacillus laterosporus*, 56.1s, număr depozit DSM 23663, care prezintă, concomitent, antagonism față de ciupercile fitopatogene din sol și capacitate ridicată de colonizare a materialului vegetal și a țesuturilor plantelor, și care este destinată utilizării în exploatațiile agricole conservative.

Nu s-au descris până în prezent tulpini de *Brevibacillus sp.* care să aibă, concomitent, activitate de antagonism față de agenții fitopatogeni din sol și capacitate de a favoriza dezvoltarea simbiozelor micorizale pe rădăcinile plantelor. Astfel de tulpini ar permite obținerea reproductibilă a unor composturi supresive cu

un conținut ridicat de spori de micoriză, stimulând formarea micorizelor pe plantele gazdă pe care sunt multiplicare ciupercile de micoriză și eliminând necesitatea aplicării de produse chimice, pentru protejarea plantelor multiplicatoare de atacul agenților fitopatogeni din sol. Brevetul CN101914469 (B) revendică tulpina HB12 de *Bacillus cereus*, depozitată cu numărul CCTCC No. M 209025, care are capacitatea de a stimula dezvoltarea ecto-micorizelor. În afara faptului că pentru această tulpină de bacterie gram-pozitivă endosporulantă nu s-au descris și proprietăți de antagonism față de fitopatogeni, un alt dezavantaj este riscul sanitar semnificativ, tulpinile de *Bacillus cereus* fiind enterotoxigene (The EFSA Journal, 2005, 175:1-48). Tulpinile care sunt utilizate pentru protecția și nutriția culturilor ornamentale din spațiile verzi (inclusiv datorită stimulării dezvoltării de endomicorize) nu trebuie să prezinte patogenitate pentru om sau organismele ne-țintă, iar această inocuitate ar trebui testată încă din faza de selecție.

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este prezentarea unei tulpini, izolată din habitate naturale, care nu este patogenă pentru om și organismele ne-țintă, și care prezintă, concomitent, caracteristici de antagonism pentru o serie de agenți fitopatogeni și de stimulare a dezvoltării de endomicorize pe rădăcinile plantelor. Pentru astfel de tulpini este necesară și realizarea unei compoziții cu eliberare controlată, care să faciliteze colonizarea substratelor cu respectivul micro-organism, asigurând formarea de composturi supresive complexe cu spori de micoriză. Această compoziție trebuie să protejeze în timp spori bacterieni, rămași ne-eliberați, de acțiunea bacteriostatică a bacteriocinelor produse de formele vegetative din aceeași specie care au colonizat deja substratul. Antagonismul față de agenții fitopatogeni al tulpinilor de bacterii gram-pozitive endo-sporulante este datorat în principal unor bacteriocine de natură lipopeptidică (Ongena și Jacques, 2008, Trends Microbiol. 16:115-125), iar aceste bacteriocine au ca rol ecologic principal limitarea dezvoltării micro-organismelor concurente, inclusiv din cadrul aceleiași specii (Riley și Wertz, 2002. Annu. Rev. Microbiol. 56 :117–137).

Această invenție se referă la tulpina de *Brevibacillus parabrevis* B50, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) B 001413 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta.

Tulpina de *Brevibacillus parabrevis* B50 a fost selectată din peste 125 de izolate provenind din sol, prezentând caracteristici superioare de:

- ✓ Antagonism *in vitro* față de agenți fitopatogeni din sol, *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Sclerotium bataticola*, *Botrytis cinerea*;
- ✓ Biosinteză de compuși care stimulează formarea micorizelor (oxid de mangan, poliamine) și dezvoltare endofită;
- ✓ Inocuitate în testul pe *Galleria mellonella*.
- ✓ Protecția plantelor de porumb, folosite ca plante gazdă pentru multiplicarea ciupercilor de micoriză, și a plantelor ornamentale de mușcată, panseluțe, petunii și creasta cocoșului, împotriva agenților fitopatogeni de sol;
- ✓ Stimularea formării de micorize pe plantele gazdă folosite pentru multiplicarea ciupercilor de micoriză, cu formarea de composturi micorizate supresive;

Compoziția cu eliberare controlată pe baza tulpinii *Brevibacillus parabrevis* B50 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 *B. parabrevis* B50.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- stimularea și protecția plantelor de porumb utilizate pentru multiplicarea ciupercilor de micoriză, excluzându-se produsele chimice care ar putea să interfere cu formarea micorizelor;
- posibilitatea obținerii reproductibile a unor composturi supresive cu un conținut ridicat de spori de micoriză, destinate protecției și nutriției biologice integrate a plantelor de cultură, în special a celor ornamentale;
- asigurarea unei colonizări uniforme și reproductibile de către tulpina B50 a substratului de creștere al plantelor micorizate, în cazul aplicării compoziției cu eliberare controlată, sporii rămași ne-eliberați din compoziția conform prezentei invenții fiind protejați de acțiunea bacteriostatică a lipopeptidelor cu activitate bacteriocinică, sintetizate de formele vegetative ale aceleași tulpini provenite din primul val eliberat, și care au colonizat deja substratul, datorită acumulării preponderente a lipopeptidelor bacteriocinice în componenta hidrofobă a compoziției;

- eliminarea riscurilor care ar rezulta din utilizarea unor tulpini bacteriene care stimulează formarea micorizelor, dar sunt potențial patogene pentru om și alte organisme ne-țintă.

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

Exemplu 1. Tulpina B50 de *Brevibacillus parabrevis* a fost obținută la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie ICECHIM, București, dintr-o probă de sol provenită din Muntenia de sud. Pentru izolarea bacteriei s-a utilizat agar nutritiv (peptona – 5 g/l, extract de carne – 3 g/l, agar – 20 g/l, la 1000 ml apă; pH 6,8-7,2), iar pentru cultivare s-a utilizat mediul Luria-Bertani agarizat (LBA: bacto-triptonă – 10 g/l, extract de drojdie – 5 g/l, NaCl – 10 g/l, agar – 20 g/l, la 1000 ml apă; pH 7,5), la o temperatură optimă de incubare de 28°C.

Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 125 izolate de bacili sporulanți gram - pozitivi, pe baza unor teste de laborator prin care s-au determinat:

- ✓ acțiunea antagonistă *in vitro* față de ciupercile fitopatogene de sol (*Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Sclerotium bataticola*, *Botrytis cinerea*),
- ✓ producerea de amilază și lactonază AHL;
- ✓ mobilitatea de migrare / *swimming* și agregare / *swarming*;
- ✓ formarea de biofilme *in vitro*;
- ✓ biosinteză de compuși care stimulează formarea micorizelor (oxid de mangan, poliamine);
- ✓ Inocuitate în testul pe *Galleria mellonella*;
- ✓ activitatea de protecție a plantulelor de porumb față de atacul de *Fusarium graminearum*, cu dezvoltarea endofită a bacteriei B50.

În vederea încadrării taxonomice, tulpina B50 a fost caracterizată pe baza unei taxonomii polifazice, respectiv a combinării unor caractere morfologice ale celulelor și ale coloniilor pe diferite medii (tabel 1), cu cele fiziologice (tabel 2) și cu cele moleculare (secvența 16S rADN, profilului de acizi grași din lipidele membranare, tab. 3). Coroborând toate aceste date, tulpina B50 a fost încadrată ca aparținând speciei *Brevibacillus parabrevis*.

Tab. 1. Morfologia celulelor și a coloniilor de *Brevibacillus parabrevis* B50 după cultivare timp de 24 ore.

Celule:	<i>forma:</i> bastonaș
	<i>dimensiuni:</i> 0,9 – 1,0 x 3.0 – >5 μm
	<i>aranjament flagelar:</i> flagel peritrich
Colonia – mediu cu decoct de cartof - glucoză agar	<i>forma:</i> circulară
	<i>aspect exterior:</i> rugoase, margini neregulate sub forma de filamente
	<i>culoarea:</i> brune
	<i>dimensiuni:</i> medii
Colonia – mediu cu extract de carne (beef extract)	<i>forma:</i> circulară
	<i>aspect exterior:</i> rugoase, centrul proeminent, încrêțit, margini neregulate
	<i>culoarea:</i> crem-bej
	<i>dimensiuni:</i> medii
Colonia – mediu cu extract de fasole	<i>forma:</i> circulară
	<i>aspect exterior:</i> rugoase, margini neregulate
	<i>culoarea:</i> crem-brun
	<i>dimensiuni:</i> medii
Colonia – mediu cu extract de sol	<i>forma:</i> circulară
	<i>aspect exterior:</i> rugoase, margini neregulate
	<i>culoarea:</i> crem-brun
	<i>dimensiuni:</i> medii

Tab. 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii *Brevibacillus parabrevis* B50.

Testul biochimic	B50
Reacția Gram	±
Reacția Voges-Proskauer	-
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Hidroliza Tween 60	+
Reducerea NO ₃ → NO ₂	+
Creștere anaeroba	-
Sursa de carbon:	
malonat	+
citrât	+
propionat	-
tartrat	+
trehaloza	+
glucoza	+
Acidifica:	
xiloza	-
glucoza	+
arabinoza	-
manitol	+
fructoza	-
celobioza	±
Toleranța la NaCl 7%	-

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin aplicarea unui protocol de lucru caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure – colonii izolate, tehnica însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului bacterian; electroforeză în gel pentru detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 16S rADN prin tehnica PCR și electroforeză în gel; purificarea ADN-ului ribozomal; amplificare enzimatică a acizilor nucleici înainte de secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-ului codificând pentru 16sRNA. Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele au fost analizate folosind programul *CHROMAS 2.33* (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene *NCBI* (National Center for Biotechnology Information), s-a realizat cu ajutorul programului *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool). Rezultatele au dovedit o similaritate de 99% cu tulpina IFO 12334 de *Brevibacillus parabrevis*.

Profilul acizilor grași membranari a fost determinat cu ajutorul unui sistem Sherlock® Microbial ID, prin folosirea procedurii Instant FAME™. Esterii acizilor grași din membrana bacteriană au fost separați pe un cromatograf de gaze GC 6890N (Agilent Technologies) echipat cu injector split/splitless clasic, coloana capilară tip Ultra 2 (cod Agilent 19091B-102, având lungimea de 25 m, diametrul interior de 0,2 mm, faza staționară 5% fenil metil siloxan, grosimea fazei staționare de 0,33 μm) și detector de ionizare în flacără (FID). Softurile utilizate pentru achiziția și prelucrarea automată a datelor cromatografice au fost: GC ChemStation, versiunea B.01.03 [204] / 2005, și Sherlock Microbial Identification System, versiunea 6.1 / 2008. S-au folosit metode cromatografice dezvoltate și validate de producător (MIDI, Inc.), utilizând bibliotecile de profile de esteri metilici ai acizilor grași pentru microorganisme aerobe din mediu (RTSBA6, versiunea 6.0 / 2008). Ca material de referință s-a folosit un amestec etalon de esteri metilici ai acizilor grași cu catenă lineară cu număr de atomi de carbon în moleculă cuprins între 9 și 20 (etalonare cantitativă pentru metodele cromatografice Sherlock rapide și sensibile). Microorganismele de referință pentru verificarea protocoalelor microbiologice și chimice de procesare a probelor au fost *Bacillus subtilis* (tulpina ATCC 6633) și *Stenotrophomonas maltophilia* (tulpina ATCC 13637).

Tab. 3. Profilul acizilor grași din membrana tulpinii B50.

Timp retenție	Tip acid gras membranar	Proportie (%)
1,8769	13:0 iso	0,97
1,9018	13:0 anteiso	0,41
2,1668	14:0 iso	3,29
2,2777	14:0	2,32
2,4762	15:0 iso	22,58
2,5055	15:0 anteiso	58,55
2,7257	16:1 w7c alcohol	0,41
2,7959	16:0 iso	2,29
2,8441	16:1 w11c	1,02
2,9135	16:0	2,02
2,9972	15:0 2OH	0,71
3,0475	17:1 iso w10c	0,58
3,1184	17:0 iso	1,57
3,1493	17:0 anteiso	2,93
3,4887	18:1 w9c	0,35

Activitatea antagonistă a tulpinii B50 față de diferite ciuperci fitopatogene a fost determinată *in vitro* prin utilizarea tehnicii culturilor duble, prin înțeparea mediului cu biomasă bacteriană la maxim 2 cm de o rondea calibrată (5 mm) de miceliu. Culturile de ciuperci fitopatogene au fost înprospătate pe mediu CGA (cartof, glucoză, agar) și incubate la 28°C timp de 5 zile. Tulpina B50 a fost înprospătată pe mediu Luria-Bertani (LB) agarizat, prin incubare la 28°C timp de 24 ore. Testarea activității antagoniste *in vitro* a fost efectuată pe mediul cu cartof-glucoza-agar (CGA). Plăcile Petri însămânțate cu microorganismele de testat au fost incubate la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) produsă de *B. parabrevis* B50, la 24, 48 și 72 ore. Experimentele de testare a antagonismului *in vitro* au fost repetate de trei ori.

Tab. 4. Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Brevibacillus parabrevis* B50 asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm).

Ciuperca fitopatogena	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina B50
<i>Fusarium graminearum</i> DSM4527	5
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> ATCC 204230	5
<i>Botrytis cinerea</i> DSM 5144	7
<i>Rhizoctonia solani</i> ATCC 66873	6
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> DSM 1946	7
<i>Sclerotium bataticola</i> ATCC 12265	8
<i>Alternaria</i> spp.	5

Rezultatele (tab. 4) au demonstrat că tulpina B50 produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciuperca *Sclerotium bataticola* ATCC 12265 (8 mm) aceasta fiind urmată de *Botrytis cinerea* DSM 5144 și *Sclerotinia sclerotiorum* DSM 1946 (7 mm).

Tulpina B50 a fost analizată în ceea ce privește producerea de enzime care au un rol important în colonizarea suprafețelor plantelor, în activitatea antagonistă și în modularea formării de consorții cu diferite tipuri de alte microorganisme.

Producerea de amilază s-a analizat prin însămânțarea sub formă de striu pe mediul nutrient agar (NA) + 0,4% amidon solubil. Plăcile au fost incubate la 28°C timp de 48...72 ore, după care s-au tratat cu soluție de iod în iodură de potasiu prin inundare. Zonele clare din jurul coloniilor bacteriene, formate după adăugarea soluției de iod în iodură de potasiu, au indicat descompunerea amidonului din mediu și deci, producerea de amilază. Rezultatele au reflectat faptul că tulpina B50 produce amilaza.

Producerea de lactonază (enzima implicată în *quorum quencing*, prin care se împiedică comunicarea dintre bacteriile dăunătoare care folosesc sistemul de *quorum sensing* de tip AHL) s-a analizat prin inocularea tulpinii B50 în 2 ml mediu lichid Luria Bertani, în care s-a adăugat C6-hexanoil homoserin lactonă (C6-HHL) în concentrație finală de 5 μM urmată de incubarea peste noapte la 28°C și 150 rpm. Simultan, același mediu numai cu C6-HHL a fost utilizat ca martor negativ, pentru a vedea dacă mediul induce lactoliza. Testul a fost efectuat pe plăci Petri cu mediul LBA (Luria Bertani cu agar) suplimentat cu 50 μg/ml kanamicină și inoculat în plaja cu tulpina biosenzor de *Chromobacterium violaceum* CV026 prin distribuția sub formă de plaja unei cantități de 250 μl dintr-o cultură de 12 ore. Pe suprafața plăcii astfel inoculate au fost efectuate godeuri cu diametrul de 5 mm în care s-au distribuit 100 μl din supernatantul culturii 56.1s. Petriurile au fost incubate peste noapte la 28°C și apoi analizate pentru prezența halourilor violete. Absența halourilor violete a indicat faptul că tot C6-HHL din mediul de creștere a fost degradat. Rezultatele au evidențiat faptul că tulpina B50a produs lactonază.

Tulpina B50 a fost testată în ceea ce privește mobilitatea de migrare la suprafața agarului (*swimming*) și de agregare (*swarming*). Ca martor a fost utilizată o tulpină standard, modificată genetic pentru a fi imobilă, *P. putida*

PCL1760 (Validov *et al.*, 2007, J. Appl. Microbiol., 102:461-471). Pentru aceasta, tulpinile au fost împrăștiate pe mediul LB suplimentat cu 1,8% agar și crescute peste noapte la 28°C. Petriuri cu 25 ml mediu LB suplimentat cu 0,3% agar, pentru *swimming*, și cu 0,5% agar pentru *swarming*, au fost preparate și lăsate să se usuce pentru 20-30 minute în hota cu flux laminar înainte de utilizare. Tulpinile au fost inoculate prin înțepare în centrul mediului cu bețișoare sterile din lemn. După 18 ore incubare la 28°C plăcile s-au analizat în ceea ce privește mobilitatea. Rezultatele au evidențiat faptul că tulpina B50 a prezentat ambele tipuri de mobilitate.

Tulpina B50 a fost testată *in vitro* în ceea ce privește formarea biofilmului prin cultivarea în mediul CM (Fall *et al.*, 2004, System. Appl. Microbiol., 27:372-379) și în mediu M63 (O'Toole și Kolter, 1998, Mol. Microbiol., 28:449-461). Împreună cu tulpina B50 au fost testate și două tulpini martor, *Pseudomonas fluorescens* WCS 365 (Simons *et al.*, 1996, Mol. Plant-Microbe Interact., 9:600-607), considerată martor pozitiv, și *Bacillus subtilis* B168 (ATCC 23857), cunoscută ca fiind slab producătoare de biofilm.

Testul a constatat în împrăștierea celulelor pe mediul LB prin incubare la 28°C timp de 18 ore, după care 10 μl au fost utilizați pentru inocularea a 0,5 ml mediu CM și, respectiv M63, distribuit în tuburi sterile Eppendorf din polipropilenă. Tuburile astfel inoculate au fost incubate peste noapte la 37°C fără agitare. Analiza fenotipică a biofilmului s-a realizat prin colorarea celulelor aderente, cu 1% m/v cristal violet, timp de 10-15 minute, după eliminarea mediului din tuburi și clătirea repetată cu apa distilată sterilă. Formarea biofilmului a fost cuantificată prin adăugarea de 2x200 μl etanol 95% și spălarea celulelor aderente colorate cu cristal violet. Etanolul a fost apoi transferat într-un tub Eppendorf de 1,5 ml, s-a ajustat volumul la 1 ml cu apa distilată sterilă, și apoi s-a determinat absorbanta la 540 nm. S-a lucrat în câte 8 repetiții, experimentele au fost repetate de trei ori, iar rezultatele s-au prelucrat prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele, prezentate în tabelul 5, demonstrează faptul că tulpina B50 are capacitate de a forma biofilme *in vitro* în cazul creșterii pe cele două tipuri de medii testate. Pe ambele medii de creștere, analiza cantitativă a biofilmului a evidențiat o diferență nesemnificativă dintre tulpina martor pozitiv WCS365, la care

capacitatea de a forma biofilm abundent a fost asociată cu activitatea de colonizare a rizosferei (Bloemberg *et al.*, 2000, Mol. Plant-Microbe Interact. 11:1170-1176) și care interacționează cu ciupercile producătoare de micoriză (Biancetto *et al.*, 1996, Protoplasma, 193:123-131), și tulpina descrisă prin această invenție, *Brevibacillus parabrevis* B50. Pe mediul de creștere CM s-a observat o mai bună dezvoltare a biofilmului, comparativ cu mediul M63, pentru toate tulpinile studiate. Inclusiv tulpina *Bacillus subtilis* B168, cunoscută ca fiind slab producătoare de biofilm, formează o cantitate mai ridicată de biofilm pe mediul CM, acest mediu fiind destinat stimulării formării de biofilme de către bacteriile gram-pozitive sporulante din ordinul *Bacillales*.

Tab. 5. Cuantificarea biofilmului format după 24 ore de creștere în condiții statice, la 28°C, a tulpinii B50 și a tulpinilor etalon, pe mediile CM și M63*.

Cod tulpina	Absorbanta 540 nm – Creștere pe mediul CM	Absorbanta 540 nm - Creștere pe mediul M63
B50	0,675±0,082a	0,202±0,046c
WCS365	0,612±0,093a	0,226±0,051c
B168	0,186±0,048b	0,096±0,026d

*media a trei experimente cu câte 8 repetiții pentru fiecare tulpină. Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P<0.05.

A fost testată capacitatea bacteriilor *B. parabrevis* B50 de a oxida manganul, pentru că a fost semnalată o corelație directă între dezvoltarea micorizelor și numărul de bacterii care oxidează manganul din rizosfera plantelor (Ariens *et al.*, 1992, Mycorrhiza, 1:127-131; Noguiera *et al.*, 2004, J. Plant Nutr. 27:141-156). Bacteriile au fost cultivate pe mediu MPSV agarizat, cu următoarea compoziție (g/l): tampon HEPES 10mM, peptonă 2g, FeSO₄ 0,001g, extract de drojdie 0,5g, MnSO₄.4H₂O 0,2g, 20g agar, pH 7. Pentru demonstrarea capacității tulpinii B50 de a oxida manganul la bioxid de mangan a fost realizat testul cu Leucoberbelin blue, acid 2-[bis(4-dimeilaminofenil)metil] benzensulfonic, substanță care formează o culoare specifică cu speciile de Mn (IV). Pentru realizarea testului peste colonia de bacterie dezvoltată pe mediu de cultură MPSV agarizat s-au adăugat câteva picături dintr-o soluție 0,04% Leucoberbelin blue. După câteva minute a apărut o colorație albastră, care indică acumularea de Mn (IV), format prin oxidarea speciilor de Mn (II) de către bacteriile B50.

A fost determinată formarea de poliamine de către bacteriilor *B. parabrevis* B50. Poliaminele au o acțiune de stimulare a creșterii rădăcinilor plantelor (Couée *et al.*, 2004, Plant Cell. Tiss. Organ. 76:1-10) și stimulează formarea de micorize pe rădăcinile plantelor (El Ghachtouli *et al.*, 1995, Mycorrhiza, 5: 189-192; Wu *et al.*, 2010, Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj., 38:25–31; Cheng *et al.* 2012, World J. Microbiol. Biotechnol., 28:1615-1621). Bacteriile au fost crescut pe mediu minimal cu următoarea compoziție (g/l): glucoză 10 g; L-alanină 890 mg (10 mM); L- acid glutamic, 1470 mg (10 mM); L-asparagină, 1320 mg (10 mM); L-lizină 1460 mg (10 mM); L-arginină 1740 mg (10 mM), amestec de săruri minerale, 100 ml. Amestecul de săruri minerale folosit a fost realizat prin dizolvarea la 1 litru a K_2HPO_4 , 30 g; KH_2PO_4 , 10 g; NH_4Cl , 5 g; NH_4NO_3 , 1 g; Na_2SO_4 , 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 10 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg; $CaCl_2$, 5 mg și ajustarea pH-ului la pH 6,8-7,0 cu acid fosforic 1 M. S-au preparat separat soluții de: glucoză 25 g/l, amestec de aminoacizi 25 mM într-un litru, amestec de săruri minerale lichid. S-au sterilizat separat fiecare din aceste soluții la 121°C, timp de 20 min și apoi au fost reunite aseptice 400 ml de soluție glucoză 25 g/l, 400 ml de soluție amestec de aminoacizi 25 mM/l, 100 ml amestec de săruri minerale. S-a ajustat pH-ul la 6,8-7,0 cu acid fosforic 1 M și s-a completat la 1 litru. Mediul a fost apoi distribuit în flacoane de 500 ml, câte 100 ml, și incubat circa 24 ore pe agitator orbital, până la atingerea unei densități optice la 600 nm $OD_{600} = 1,22$, corespunzând la aprox. $1,18 \cdot 10^8$ ufc/ml, ceea ce reprezintă sfârșitul fazei exponențiale de dezvoltare. La atingerea acestui prag s-a separat cultura bacteriană prin centrifugare la 5000xg pentru 20 min la 4°C. Supernatantul a fost acidificat cu acid percloric, până la obținerea unei soluții de concentrație finală 5%. Supernatantul acidificat a fost derivatizat prin dansilare (Cassan *et al.*, 2009. Eur. J. Soil Biol., 45 :12-19). Poliaminele au fost separate și identificate prin cromatografie în strat subțire, folosind amestecuri cloroform-trietanolamină (9:1) și n-hexan- acetat de etil (2:1) și comparându-le cu valorile compușilor standard dansilați. Plăcile de silicagel au fost observate în lumină UV, spoturile selectate au fost trecute cantitativ de pe placă într-o eprubetă. Din silicagel s-au eluat poliaminele dansilate cu soluție de metanol-toluen (9:1). Fluorescența a fost măsurată prin spectrofluorimetrie, folosind lumină de excitare de 415 nm și lumină de emisie de 510 nm. Fiecare experiment a inclus câte 5 flacoane, iar experimentele s-au repetat de trei ori.

Tulpina *B. parabrevis* B50 produce $4,25 \pm 0,63$ nmol/ml cadaverină în mediu de cultură, și $5,12 \pm 0,37$ nmol/ml putresceină. Producția de cadaverină în mediu de cultură sintetic este mai mare decât a tulpinii de *Azospirillum brasiliense* Az39, la care capacitatea de a produce cadaverină a fost asociată cu activitatea de favorizare a creșterii plantelor de cultură (Cassan *et al.*, 2009. Eur. J. Soil Biol., 45 :12-19).

Tulpina *B. parabrevis* B50 a fost analizată în ceea ce privește inocuitatea pe larve de *Galleria mellonella*, în conformitate cu protocolul descris de Seed și Denis, 2008, Infect. Immunit. 76:1267-1275. Pentru aceasta, tulpina B50 de *B. parabrevis* a fost cultivată pe mediul LB la 28°C cu agitare la 150 rpm timp de 48 ore, după care a fost centrifugată la 4000 rpm, iar sedimentul a fost resuspendat în 10mM MgSO₄ și injectată în larve de *Galleria mellonella*. 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 amestecul pulverulent rezultat 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 diluții seriale, iar larvele de *G. mellonella* s-au injectat cu o concentrație bacteriană de 10⁶ ufc/ml în soluție 10 mM MgSO₄. S-a lucrat față de o variantă martor, la care larvele 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. Fiecare variantă experimentală a cuprins câte 60 larve, fiind organizate câte trei repetiții cuprinzând fiecare loturi de câte 20 de larve. Monitorizarea larvelor (moarte, vii, crisalide) s-a făcut la 48-72 ore după infecție, pentru larvele menținute la 30°C. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6 de mai jos.

Tab. 6. Mortalitate larvelor de *Galleria mellonella* în experimentul de testare a inocuității tulpinii *B. parabrevis* B50.

Varianta	Repetiția	24 ore post-tratament		48 ore post-tratament		72 ore post-tratament		
		vii	moarte	vii	moarte	vii	moarte	crisalide
Martor 10 mM MgSO ₄ + 1,2 mg/ml ampicilină	R1	20	0	19	1	19	1	2
	R2	20	0	20	0	19	1	1
	R3	20	0	19	1	18	1	-
B50 10 ⁶ ufc/ml	R1	20	0	19	1	19	1	-
	R2	19	1	18	2	18	2	1
	R3	19	1	19	1	19	1	1

Datele din tab. 6 demonstrează faptul că tulpina testată, *B. parabrevis* B50, 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 B50 nu este patogenă pentru metazoare și nu prezintă riscuri pentru sănătatea umană.

Pentru determinarea capacității de colonizare a materialului vegetal s-au utilizat paie de grâu sterilizate prin iradiere gamma. Paie sterile de circa 6... 7 cm au fost depuse aseptice pe plăci petri cu diametrul de 9 cm, care conțineau hârtie de filtru umectată cu tampon fosfat salin steril. Pe un capăt al paiului de grâu s-au depus 10 μl suspensie bacteriană conținând 10⁶ ufc/ml B50. După 48 ore s-a prelevat aseptice capătul celălalt al paiului (cca 2 cm), care s-au trecut într-o eprubetă cu 10 ml tampon fosfat salin steril. Din suspensia izolată s-au prelevat 0,5 ml care s-au diluat serial de trei ori și s-au inoculat pe nutrient agar. Coloniile formate au fost re-identificate ca fiind *Brevibacillus parabrevis*, pe baza unui test de microetalarie fenotipică de tip Biolog și a testelor API 20E. Concluzia experimentului a fost că tulpina bacteriană B50 prezintă capacitate de colonizare a materialului vegetal.

Pentru a verifica activitatea de protecție a plantelor de porumb împotriva atacului de *Fusarium graminearum* s-a realizat o experiență în condiții controlate. Semințele de porumb sterilizate chimic prin spălări repetate cu hipoclorit au fost

bacterizate cu o suspensie bacteriană de 10^8 ufc/ml. S-a lucrat față de un martor neinoculat și cu un martor etalon, tratat cu un produs chimic (2g/kg, metiltiofanat 70%). Infecția s-a realizat prin tratarea soluției nutritive cu o suspensie concentrată de spori, astfel încât numărul de spori per ml de soluție nutritivă a fost de 10^4 ufc/ml. Variantele experimentale au fost: V_1 – inoculare *B. parabrevi* B50; V_2 – inoculare *B. parabrevi* B50 + *F. graminearum* DSM4527; V_3 – metil-tiofanat 70% echivalent 2 g/kg + *F. graminearum* DSM4527; V_4 - Martor neinoculat cu bacterii sau ciuperci microscopice fitopatogen. Fiecare variantă a fost realizată în 5 repetiții. S-au utilizat pungi sterile de creștere cyg (Mega International, West St. Paul, MN, SUA), iar în fiecare pungă s-au plasat 3 semințe pre-germinate. Pungile au fost amplasate randomizat într-o cameră de creștere. Plantulele au fost crescute în condiții controlate într-o cameră climatică (Model SGC 120 LED, Weiss Gallenkamp, Loughborough, Marea Britanie) la o temperatură de $22^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, iluminare 12 ore pe zi cu $250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$, timp de 10 zile. Rezultatele finale au arătat că tulpina B50 are o eficacitate de 91%, cu aproape 3% mai mult decât etalonul chimic metil-tiofanat. Deci tulpina B50 prezintă un antagonism semnificativ pentru *F. graminearum* și *in vivo*, în condiții controlate.

S-au prelevat aseptice părți din tulpinița plantulelor provenite din semințe pre-germinate tratate cu tulpina B50. Tulpinițele s-au trecut într-o eprubetă cu 10 ml tampon fosfat salin steril. Din suspensia izolată s-au prelevat 0,5 ml care s-au diluat serial de trei ori și s-au inoculat pe nutrient agar. Coloniile formate au fost re-identificate ca fiind *Brevibacillus parabrevi*, pe baza unui test de microetalare fenotipică de tip Biolog și a testelor API 20E. S-a concluzionat că tulpina B50 are capacitatea de a coloniza endofit plantele de porumb pe care le protejează împotriva atacului unor agenți fitopatogeni din sol.

Exemplul 2. Tulpina *B. parabrevi* B50 a fost testată din punct de vedere al capacității antagoniste *in vivo*, pentru protecția plantelor ornamentale împotriva agenților fitopatogeni de sol. Semințe de mușcată hibridă (*Pelargonium x hortorum*) „Moulin Rouge” au fost însămânțate pe 18 aprilie, pentru a obține plantele stoc, din care s-au obținut prin butășire, la începutul lunii septembrie, plantele pentru experimente. Butășii au fost plasați în cameră umedă în vermiculit, pentru a stimula dezvoltarea rădăcinilor. După trei săptămâni butășii uniformi ca dezvoltare a rădăcinilor și tulpinii au fost plantați în ghivece de plastic

de 15 cm, conținând un substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV, Oosterhout, Olanda). Ghivecele au fost menținute în condiții de seră, la $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul zilei și $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai după trei săptămâni de creștere, prin aplicarea a 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$, Eurofertil, TimacAgro Romania).

Experimentul de testare *in vitro* a inclus următoarele variante:

V_1 - martor neinoculat (cu fitopatogen sau B50)

V_2 – inoculat cu *B. parabrevis* B50, 10^6 spori/ml, la 4 săptămâni de la transplantare

V_3 – inoculat cu *P. ultimum*, DSM 62987, 10^6 propagule/ml, 8 săptămâni după transplantare;

V_4 - inoculat cu *B. parabrevis* B50, 10^8 spori/ml, la 4 săptămâni de la transplantare și cu *Pythium ultimum*, DSM 62987, 10^6 propagule/ml, 8 săptămâni după transplantare.

Fiecare variantă a inclus 12 ghivece, care au fost aranjate în blocuri de câte trei per repetiție, într-o schemă randomizată de tip pătrat latin, 4 variante în 4 repetiții.

La 4 săptămâni de la transplantarea butașilor în sol au fost inoculate variantele V_2 și V_4 , cu câte 50 ml de tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2, conținând 10^8 ufc/ml spori de *B. parabrevis* B50. Tulpina antagonistă a fost cultivată pe mediu lichid LB timp de 3 zile. Sporii formați au fost reluați în tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2. Normalizarea numărului de spori a fost făcută prin numărare prin tehnica unităților formatoare de colonii. Celelalte variante, V_1 și V_3 , au fost tratate cu câte 50 ml tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2.

La 8 săptămâni de la transplantarea butașilor au fost inoculate variantele V_3 și V_4 cu *Pythium ultimum*. Întrucât la temperatura camerei *P. ultimum* nu produce zoospori (van der Plaats-Niterink, 1981, Monograph of the genus *Pythium*. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, Baarn, Olanda, pp. 164–167), suspensia de propagule de *P. ultimum* a fost realizată din

hife și oospori, fiind preparată prin cultivare pe mediu lichid (erlenmeyere de 250 ml), care conțineau 100 ml de mediu lichid cartof – glucoză, incubat pe un agitator rotativ, la 150 rotații pe min, timp de 7 zile la 24°C. Numărul de propagule a fost determinat prin numărare la cameră de numărare, aducându-se la 10⁶ ufc/ml în mediu lichid cartof – glucoză.

La 4 săptămâni de la infecția cu *P. ultimum*, respectiv 12 săptămâni de la butășire, a fost cântărită masa proaspătă și cea uscată a rădăcinilor și a părților aeriene (tulpini și frunze) ale plantelor de mușcată. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 7 și demonstrează atât existența unui antagonism al tulpinii *Brevibacillus parabrevis* B50 față de *P. ultimum*, cât și capacitatea acestei tulpini de a determina a stimulare a creșterii plantelor de mușcată, în condițiile experimentale date.

Tab. 7. Efectul tratamentelor cu *B. parabrevis* B50 asupra dezvoltării bolii produse de *P. ultimum* la mușcate și asupra creșterii plantelor de mușcată.

Variantă experimentală	Masă rădăcină, g		Masă tulpină, g	
	proaspătă	uscată	proaspătă	uscată
V ₁ - martor neinoculat	13,22b	1,81b	109,26c	15,12bc
V ₂ - <i>B. parabrevis</i> B50, 10 ⁸ spori/ml	16,42a	2,94a	134,12a	17,86a
V ₃ - <i>P. ultimum</i> , DSM 62987, 10 ⁶ propagule/ml	10,42c	1,18c	103,42c	14,09c
V ₄ - <i>B. parabrevis</i> B50, 10 ⁸ spori/ml <i>P. ultimum</i> , DSM 62987, 10 ⁶ propagule/ml	14,12ab	2,38a	118,73b	16,47ab
DL 5%	1,68	0,45	9,42	1,14

Exemplul 3. Tulpina *B. parabrevis* B50 a fost multiplicată și inclusă într-o compoziție care să-i faciliteze colonizarea substratului de creștere și/sau a rizosferei. Multiplicarea s-a realizat pe un mediu care conținea 10 g/l glucoză, 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 ore. După 48 ore s-a atins un nivel al populației bacteriene de 5,8 x10⁹ 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 8 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. 8. 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):

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 și s-au folosit pentru obținerea compoziției cu eliberare controlată conținând tulpina B50.

Compoziția cu eliberare controlată pe baza tulpinii *B. parabrevis* B50 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 *B. parabrevis* B50.

Numărul de bacterii *B. parabrevis* B50 în compoziția realizată a fost verificat prin suspendarea a 0,1 g de compoziție în tampon fosfat salin steril, diluarea serială a suspensiei inițiale și etalarea pe nutrient agar.

Exemplul 4. Tulpina *B. parabrevis* B50 și compoziția obținută cf. Ex.3 pe baza ei au fost utilizate pentru a realiza compost micorizat. Multiplicarea ciupercilor de micoriză biotrofe s-a realizat pe rădăcini de porumb și fasole. Plantele au fost crescute pe substrat de creștere alcătuit din sol, nisip, vermiculit și rocă fosfatică, în raport 2:1:1:0,1, distribuit în lădițe de lemn căptușite cu folie neagră de polietilenă, perforată pentru a permite drenarea. Fiecare lădiță a fost umplută cu 200 litri de substrat de creștere, care au ocupat circa 80% din volumul disponibil. Au fost însămânțate alternativ boabe de porumb și fasole, la 10 cm unele de altele. Sporii de *Glomus intraradices* MUCL 43204, proveniți din cultură axenică, au fost multiplicați pe rădăcini de *Medicago truncatula*, conform protocolului descris de Chabaud *et al.* 2006, în: Mathesius, U., Journet, E.P. și Sumner, L.W. (eds), *The Medicago truncatula handbook*, <http://www.noble.org/MedicagoHandbook>, ISBN 0-9754303-1-9. Spori de ciuperci de micoriză au fost recuperați din substratul de creștere prin sitare orbitală umedă. Câte 300 spori au fost dezinfectați prin spălări succesive, mai întâi timp de 15 min cu 30 ml soluție de Cloramină T / Tween 20 (1 g Cloramină T și 0,25 ml Tween 20, aduși la 100 ml soluție cu apă distilată), la temperatura camerei, urmată de o spălare cu 30 ml soluție de 200 μg/ml sulfat de streptomycină, sterilizată prin filtrare, timp de 1 oră la 4°C, și în final de 5 clătiri abundente cu apă distilată sterilă.

Experimentul s-a lucrat cu următoarele variante experimentale:

V₁ – martor, substrat de creștere ne-inoculat cu ciuperci de micoriză sau bacterii;

V₂ – substrat de creștere inoculat cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, 300 spori per sămânță;

V₃ – substrat de creștere inoculat cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, 300 spori per sămânță și bacterii *B. parabrevis* B50, 10 ml x10⁸ ufc/ml;

V₄ – substrat de creștere inoculat cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, 300 spori per sămânță și 10 g preparat cf. Ex.3, cu 10⁸ ufc/g *B. parabrevis* B50.

Fiecare variantă a fost realizată în 4 repetiții, fiecare repetiție fiind constituită din câte trei lăzi. Experimentul a fost amplasat randomizat în pătrat latin. Lădițele cu plantele pe care se dezvoltau ciupercile de micoriză au fost menținute în condiții de seră, la 22±2°C în timpul zilei și 17±2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 mcE/m²/s, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub 500 mcE/m²/s. Plantele au fost crescute timp de 12 săptămâni, fiind fertilizate la interval de două săptămâni, prin aplicarea a câte 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-0-20 (N-P₂O₅-K₂O), preparat din azotat de amoniu și azotat de potasiu, pe fiecare lădiță. De două ori pe săptămână plantele au fost udare la 80% din capacitatea de reținere a apei în substratul de creștere. După 12 săptămâni plantele au fost tăiate la baza tulpinii și s-a oprit udarea, pentru a stimula producerea de spori de către ciupercile de micoriză. După 10 zile au fost extrase rădăcinile din sol, care au fost tăiate în bucăți de aprox. 1 cm și apoi re-amestecate cu substratul de creștere. Materialul rezultat reprezintă compost micorizat, suplimentat, în cazul folosirii de bacterii B50 și cu această bacterie.

În probe din materialele rezultate din fiecare ladă a fost determinat numărul de ciuperci de micoriză (AMF). Numărul de AMF s-a determinat prin numărare directă a sporocarpilor și a sporilor formați în substrat, extrași prin sitare umedă și centrifugare în gradient de densitate de zaharoză (Oehl *et al.* 2003, Appl. Environ. Microbiol. 69: 2816–2824). Determinarea s-a realizat pe 50 g probe substrat de creștere uscat la aer, care a fost sitat umed pe un sistem orbital de sitare (model AS 200, Retsch, Haan, Germania), cu site de 1,000-, 500-, 125-, and 32-μm. Materialul reținut pe sita de 1000-μm a fost verificat pentru sporii adiacenți

sistemului radicular, iar cel de pe sita de 500- μ m a fost verificat pentru spori de dimensiuni mari, aglomerări de spori sau sporocarpii. Conținutul sitelor 125- and 32- μ m a fost depus pe o soluție de 70% apă-zaharoză (masă/volum) și centrifugat la 900 x g pentru 2 min. Supernatantul rezultat a fost re-trecut pe sita 32- μ m, spălat cu apă de robinet și transferat în plăci Petri. Sporii, aglomerările de spori și sporocarpii obținuți de pe toate tipurile de site au fost numărați prin folosirea unui microscop de disecție, la o mărire de până la x90. Apoi, de la 50 până la 70% dintre spori au fost montați pe lame cu alcool polivinilic – acid lactic – glicerol (Koske și Tessier, 1983, Mycol. Soc. Am. Newsl. 34:59). Au fost montați numai sporii sănătoși. Spori au fost examinați la un stereomicroscop (SZX10, Olympus, Tokio, Japonia), la o mărire de până la x80. Abundența sporilor a fost determinată pentru fiecare probă și exprimată ca număr de spori AMF per 50 grame de substrat de creștere. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 9. Aceste rezultate indică o stimulare a dezvoltării micorizelor și formării de spori pe plantele tratate cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, care este semnificativ influențată de tratarea concomitentă și cu bacterii *B. parabrevis* B50, în variantele experimentale în care a fost aplicată și această bacterie.

Tab. 9. Producerea de spori de ciuperci de endomicoriză (AMF), per 50 grame de substrat de creștere, în variantele experimentale realizate*

Varianta experimentală	Număr spori AMF	% față de varianta inoculată numai cu <i>G. intraradices</i>
V ₁ – martor, ne-inoculat cu ciuperci de micoriză sau bacterii	12±5	-
V ₂ – inoculat cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204, 300 spori per sămânță	236±28	100
V ₃ – inoculat cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204, 300 spori per sămânță și bacterii <i>B. parabrevis</i> B50, 10 ml x10 ⁸ ufc/ml;	314±35	133,05
V ₄ – inoculat cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204, 300 spori per sămânță și 10 g preparat cf. Ex.3, cu 10 ⁸ ufc/g <i>B. parabrevis</i> B50.	386±28	163,55

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P<0.05.

Includerea bacteriei *B. parabrevis* B50 în compoziția realizată conform Ex. 3 de ilustrare a invenției, determină o stimulare suplimentară a formării de micorize, care este explicabilă prin mai buna colonizare a substratului pe care această compoziție o asigură bacteriilor.

Exemplul 5. Materialele compost micorizat realizate conform Ex.4 au fost testate din punct de vedere al capacității de a proteja răsadurile de plante ornamentale de căderea plantulelor produsă de *Rhizoctonia solanii*, într-un experiment realizat în condiții de seră.

Inoculul de *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873, grup de anastomoză AG4, a fost cultivat pe tărâțe de grâu timp de 10 zile. Tărâțele de grâu au fost sitate pentru a obține fracția de 0,25 ... 0,5 mm, spălate cu apă distilată, repartizate în plăci Roux și sterilizate, repetat de două ori, prin autoclavare la 121°C, timp de 30 min. Tărâțele au fost distribuite câte 100 g în plăci Roux de 450 ml, umectate cu câte 50 ml tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2 și inoculate cu 1 ml suspensie de 10⁶ propagule/ml obținute din culturi pe mediu agarizat.

Substratul de creștere pentru plantele ornamentale a fost reprezentat de substratul Potground H70 (Klasmann – Delimann, Geeste, Germania), cu pH 6,0, care conține 25% turbă blondă 0-7 mm, 75% turbă neagră și 1,5 g/l îngrășământ complex NPK, destinat producerii de răsaduri de legume și flori.

Creșterea răsadurilor de flori ornamentale s-a realizat în tăvițe alveolare cu 32 de alveole (model EPE 32, Marcoser, Matca, Galați, România), care aveau un volum de 102 ml pentru fiecare alveolă.

Plantele ornamentale folosite pentru experiment au fost panseluțele (*Viola x wittrockiana* cv. Berna), petuniile (*Petunia x hybrida* cv. Colour parade F1), creasta cocoșului (*Celosia cristata*, cv. Orange).

Substratul de creștere a fost amestecat cu tărâțe infectate, în raport de 0,25% v/v; 7 ml din acest amestec inoculat a fost distribuit în alveolele fiecărei tăvițe, iar peste acest substrat infectat cu *Rhizoctonia solanii* au fost depuși câte 68 ml de compost micorizat realizat conform Ex.4, cu sau fără bacterii *B. parabrevis* B50. În cazul variantei martor neinoculat substratul de creștere a fost amestecat cu tărâțe de grâu sterilizate prin autoclavare și umectate cu tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2.

Variantele experimentale au inclusiv și un tratament cu un produs standard chimic, propamocarb condiționat (Previcur 607 SL, Bayer Crop Science, 607 g ingredient activ per litru). Propamocarbul condiționat a fost diluat 1% în apă deionizată, iar din această soluție s-au aplicat câte 3 ml per alveolă cu diametru de 6,2 cm, corespunzând unei doze recomandate de 10 ml produs condiționat per metru pătrat de sol pentru răsaduri. Martorul neinoculat și varianta netratată cu produse împotriva căderii plantulelor au fost tratate cu câte 3,25 ml tampon fosfat steril, 0,1 M, pH 7,2.

În fiecare alveolă au fost introduse semințe din plantele ornamentale deja precizate. Plantulele au fost menținute în condiții de seră, la $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul zilei și $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$. Substratul conținea rezerve de nutriție inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai după două săptămâni de creștere, prin aplicarea a 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 (N-P₂O₅-K₂O, Eurofertil, TimacAgro Romania).

Fiecare variantă, V₁ - martor neinfestat, V₂ - variantă infestată cu *R. solanii* și netratată cu produse împotriva căderii plantulelor, V₃ - tratament cu produs chimic; V₄ - tratament cu compost micorizat obținut prin inocularea substratului de creștere cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, V₅ - tratament cu compost micorizat obținut prin inocularea substratului de creștere cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204 și bacterii *B. parabrevis* B50; V₆ - tratament cu compost micorizat obținut prin inocularea substratului de creștere cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, și preparat *B. parabrevis* B50 cf. Ex.3, a fost realizată în 4 repetiții, fiecare repetiție fiind reprezentată de o tavă cu alveole, cu o plantă ornamentală testată. Tăvile cu alveole au fost aranjate în bloc randomizat în seră, plantele gazdă fiind randomizate între blocuri, iar diferitele tratamente experimentale fiind randomizate în cadrul sub-blocurilor plantă gazdă.

La 3 săptămâni de la semănarea plantelor, a fost determinată rata de supraviețuire a răsadurilor de plante ornamentate. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 10 și arată o eficacitate ridicată a tulpinii bacteriene *B. parabrevis* B50,

prezentă în composturile micorizate realizate conform Ex. 4, în ceea ce privește protecția față de căderea plantulelor determinată de *R. solanii* AG-4.

Tab. 10. Influența diferitelor tratamente experimentale asupra supraviețuirii plantulelor de plante ornamentale crescute pe substrat inoculate cu *R. solanii* AG-4

Varianta experimentală	Număr mediu plante per tavă cu 32 alveole:		
	<i>Viola x wittrockiana</i>	<i>Petunia x hybrida</i>	<i>Celosia cristata</i>
Martor neinoculat cu <i>R. solanii</i> AG-4 și netratat	25,25	24,75	24,5
Martor inoculat cu <i>R. solanii</i> AG-4 și netratat	4,25	6,75	9,75
Propamocarb, echiv. 10 ml p/c per m ²	19,25	20,75	22,75
Compost micorizat obținut prin inocularea substratului de creștere cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204	9,25	10,25	11,75
Compost micorizat obținut prin inocularea substratului de creștere cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204 și bacterii <i>B. parabrevis</i> B50	16,25	17,75	18,25
Compost micorizat obținut prin inocularea substratului de creștere cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204, și preparat <i>B. parabrevis</i> B50cf. Ex.3	18,25	20,25	21,5
DL5%	6,75	7,25	5,5

Materialul compost micorizat care conținea numai *Glomus intraradices* a prezentat activitate de protejare a plantelor de atacul fitopatogenului *R. solanii* AG-4, probabil datorită activării sistemului de apărare din plante, dar această activitate este însă sub limita de eficacitate necesară aplicării în practică. Prezența bacteriei *B. parabrevis* B50 în materialul compost micorizat crește eficacitatea de combatere a atacului de *R. solanii* AG-4. Utilizarea compoziției, conform invenției, pe bază de bacterie B50, determină o colonizare mai bună de către aceasta a materialului compost micorizat, asigurând o eficacitate de combatere a atacului de *R. solanii* AG-4 similară produsului chimic. Materialul compost micorizat cu bacterii B50 prezintă deci caracteristicile unui compost supresiv.

REVENDICARI

1. Tulpina de *Brevibacillus parabrevis* B50, NCAIM (P) B 001413, **caracterizată prin aceea că** prezintă caracteristici superioare de: antagonism *in vitro* față de agenți fitopatogeni din sol, *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Sclerotium bataticola*, *Botrytis cinerea*; biosinteză de compuși care stimulează formarea micorizelor (oxid de mangan, poliamine); dezvoltare endofită; inocuitate în testul pe *Galleria mellonella*; protecția plantelor de porumb, folosite ca plante gazdă pentru multiplicarea ciupercilor de micoriză, și a plantelor ornamentale de mușcată, panseluțe, petunii și creasta cocoșului, împotriva agenților fitopatogeni de sol; stimularea formării de micorize pe plantele gazdă folosite pentru multiplicarea ciupercilor de micoriză, cu formarea de composturi micorizate supresive.
2. Compoziția cu eliberare controlată pe baza tulpinii *Brevibacillus parabrevis* B50 **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 *B. parabrevis* B50