



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00421

(22) Data de depozit: 12.06.2012

(41) Data publicării cererii:
30.05.2014 BOPI nr. 5/2014

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA SAPIENȚIA,
STR.MATEI CORVIN NR.4, CLUJ NAPOCA,
CJ, RO

(72) Inventatori:
• BENEDEK TIBOR, SAT SUSENI NR. 229,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• MATHE ISTVAN,
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• MARIALIGETI KAROLY, ELEK UTCA 16
SZAM, BUDAPESTA, HU, HU;

• MARA GYONGYVER, PIAȚA LIBERTĂȚII
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• GYORGY EVA, STR.TOPLIȚA NR.50,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• ABRAHAM BEATA, STR. CULMEI BL.11,
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LANYI SZABOLCS, STR.MIKO NR.21,
MIERCUREA CIUC, HR, RO

(74) Mandatar:
HARCOV A.P.I. S.R.L.,
STR. NICOLAE IORGA NR.61, BL. 10E,
SC. B, AP.9, SFÂNTU GHEORGHE,
JUDEȚUL COVASNA

(54) CONSORȚIU MICROBIAN CU CAPACITATEA DE A DESCOMPUNE HIDROCARBURI PETROLIERE ÎN PREZENȚA METALELOR GRELE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un consorțiu microbial care, în formă de bioinoculant, este utilizat pentru tratamentul solurilor dintr-o zonă industrială, cu un conținut relativ mare de hidrocarburi petroliere și de metale grele, în condițiile în care contribuie la dezvoltarea plantelor cultivate. Consorțiul conform invenției este alcătuit din tulpini BBG1 de *Rhodococcus qingshengii* și BBN1 de *Pseudomonas fluorescens*, înregistrate la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numerele de înregistrare NCAIM (P) B001401 și, respectiv, NCAIM(P) B001400, având capacitatea de a biodegrada hidrocarburi alifatiche - *n*-dodecană-mono-aromate - benzen, toluen, xilen - și aromatice policiclice - naftalină - prin rezistență crescută față de metale grele - Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} - și, respectiv, prin exercitarea unor proprietăți benefice asupra dezvoltării plantelor - producerea de siderofori, mobilizarea fosfaților anorganici din complecși insolubili, hidrolizarea carbamidelor și a gelatinei - fiind adecvat pentru remedierea biologică a solurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere, chiar și în prezența unor metale grele, contribuind, în același timp, și la dezvoltarea plantelor.

Revendicări: 5
Figuri: 2

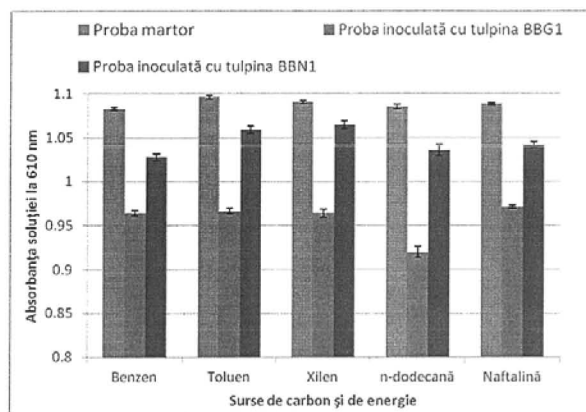
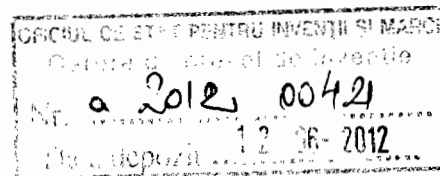


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





CONSORȚIU MICROBIAN CU CAPACITATEA DE A DESCOMPUNE HIDROCARBURI PETROLIERE ÎN PREZENȚA METALELOR GRELE

Prezenta invenție se referă la un consorțiu microbial, alcătuit din tulpinile autohtone izolate din sol contaminat cu hidrocarburi, respectiv cu metale grele. Acest consorțiu în formă de bioinoculant este adecvat pentru tratamentul solurilor zonelor industriale cu un conținut ridicat de hidrocarburi petroliere și de metale grele și în același timp contribuie la dezvoltarea plantelor în interiorul zonei tratate.

Nu s-au descris până în prezent tulpini de *Rhodococcus qingshengii* care să aibă concomitent activitate de descompunere a hidrocarburilor alifatiche, mono-aromatice, policiclice aromatice și respectiv rezistență față de metale grele (Pb^{2+} , Zn^{2+} și Cu^{2+}).

Capacitățile benefice ale tulpinilor *Pseudomonas fluorescens* asupra creșterii plantelor au fost deja demonstrate în numeroase studii. Brevetul US006048713A se referă la tulpina HP72 de *Pseudomonas fluorescens* și protejează tulpina cu o capacitate de stimulare a creșterii plantelor respectiv cu capacitate antagonistică asupra unor fungi patogene. Cererea de brevet US005919448A descrie tulpina FPT-9601 de *P. fluorescens* cu o capacitate crescută de stimulare a creșterii plantelor.

Problema pe care rezolvă invenția este realizarea unui biopreparat bacterian compus din tulpina *Rhodococcus qingshengii* BBG1 și *Pseudomonas fluorescens* BBN1 izolate din sol, pentru bioremedierea solurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere.

Consorțiul microbial este alcătuit din tulpinile *R. qingshengii* BBG1 și *P. fluorescens* BBN1 realizând bioremedierea solurilor contaminate cu hidrocarburi, respectiv cu metale grele contribuind în același timp la stimularea creșterii plantelor din interiorul zonei tratate.

Cele două tulpini bacteriene *Rhodococcus qingshengii* BBG1 și *Pseudomonas fluorescens* BBN1 sunt depuse la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numere de depozit NCAIM(P)B001401 și NCAIM(P)001400.

Procedeele de obtinere a unui biopreparat care poate fi folosită în bioremedierea unor soluri contaminate cu hidrocarburi petroliere cu ajutorul tulpinilor bacteriene

Rhodococcus qingshengii BBG1 și *Pseudomonas fluorescens* BBN1 izolate din sol, conform invenției, constă în aceea că, cuprinde obținerea unui inocul, prin izolarea celor două tulpini în mediu mineral lichid Bacto-Bushnell-Haas suplimentat cu motorină, ca unică sursă de carbon (incubat la 28°C timp de 72 ore) și prin cultivarea bacteriilor obținute în mediul nutritiv Nutrient Broth (timp de incubare la 28°C - 48 ore).

Realizarea invenției are următoarele avantaje:

- această consorție bacteriană contribuie la degradarea n-dodecanei, benzenului, toluenului, xilenului, naftalinei;
- consorția bacteriană poate tolera prezența unor metale grele (Pb^{2+} , Zn^{2+} și Cu^{2+}) în concentrații ridicate;
- contribuie la mobilizarea substanțelor nutritive pentru plante (producerea de siderofori, mobilizarea fosfaților anorganici din complecși insolubili, hidrolizarea carbamidei și a gelatinei), favorizând astfel creșterea plantelor.

Consoțriul microbial alcătuit din tulpinile *R. qingshengii* BBG1 și *P. fluorescens* BBN1 prezintă următoarele avantaje:

- Rată de creștere ridicată pe mediile uzuale utilizate pentru creșterea bacteriilor;
- Capacitate de biodegradare a diferitelor poluanți din motorină: benzen, toluen, xilen, n-dodecană și naftalină;
- Datorită tulpinii *P. fluorescens* BBN1 bioinoculantul are și capacități benefice asupra creșterii plantelor prin producția de siderofori, mobilizarea fosforului anorganic și hidroliza carbamidei;
- Datorită capacității de rezistență față de metale grele a tulpinilor, bioinoculantul poate să fie aplicabilă și în bioremedierea terenurilor contaminate cu hidrocarburi cu un conținut ridicat de metale grele.

Se dă un exemplu de realizare a invenției:

Tulpinile BBG1 de *R. qingshengii* și BBN1 de *P. fluorescens* au fost izolate la Universitatea Sapiientia - Centrul de Cercetare de Biochimie, Biologie și Biotehnologie (BIBIRC) din probe de sol contaminate cu hidrocarburi petroliere respectiv cu metale grele, provenite de la exploatarea minieră Bălan. Tulpinile au fost izolate folosind un mediu mineral lichid Bacto-Bushnell-Haas suplimentat cu motorină, ca unică sursă de

carbon (incubare la 28°C timp de 72 ore). Bacteriile astfel obținute au fost înmulțite în mediu lichid Nutrient Broth (peptonă-5 g; extract de carne-1 g; extract de drojdie-2 g; NaCl-5 g, apă distilată-1000 ml) în care au prezentat o proliferare intensă. Tulpinile BBG1 și BBN1 au fost selectate dintr-o colecție de 25 izolate, pe baza capacității lor remarcabile de descompunere a hidrocarburilor (hidrocarburi alifatici, mono-aromatici și policiclici aromatici), respectiv datorită abilității crescute de rezistență față de metale grele (Pb^{2+} , Zn^{2+} și Cu^{2+}).

În vederea încadrării taxonomice tulpinile BBG1 și BBN1 au fost caracterizate din punct de vedere biochimic și pe baza secvenței 16S ADNr (Tabelul 3).

Tabelul 1. Morfologia coloniilor de *Rhodococcus qingshengii* BBG1 și *Pseudomonas fluorescens* BBN1

Tulpina	Mediul utilizat	Culoarea coloniilor	Dimensiuni (48)	Aspect exterior
BBG1	Agar nutritiv	Roz alb	Colonii mici	Colonii convexe cu margini puțin neregulate
BBN1	Agar nutritiv	Verde gălbuie	Colonii mari	Colonii convexe cu margini regulate, suprafață lucioasă

Tabelul 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinilor BBG1 și BBN1.

Test	Tulpina testată	
	BBN1	BBG1
Reacția Gram	-	+
Reacția Voges-Proskauer	-	+
Hidroliza amidonului	-	-
Hidroliza gelatinei	+	-
Reducerea $NO_3 \rightarrow NO_2$	-	-
Creștere anaeroba	-	-
Catalaza		+
Surse de carbon		
Glucoza	+	+
D-mannoz	+	+
D-mannitol	+	-

Identificare

Identificarea pe baza secvenței 16S ADNr s-a realizat prin amplificarea PCR utilizând primeri 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') (Lane, 1991) și 1492R

(5'-TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Polz and Cavanaugh, 1998). Înaintea reacției de secvențiere fragmentele amplificate au fost purificate cu Viogene DNA Purification Kit (Viogene Biotek-Corp., Taiwan) în conformitate cu specificațiile producătorului. Pentru reacția de secvențiere s-a utilizat kitul Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Secvențierea produșilor s-a realizat prin metoda electroforezei capilare, folosind secvențiator automat ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Secvențele astfel obținute au fost analizate cu ajutorul software-ului *MEGA5* și comparate cu secvențele existente în Banca de Gene NCBI (National Center for Biotechnology Information) prin folosirea algoritmului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Pentru o identificare mai eficientă a tulpinilor pe baza fragmentelor 16S ADNr s-a folosit baza de date EzTaxon. Dacă similaritatea între secvențele 16S ADNr ale bacteriilor studiate și cele existente în banca de gene este mai mare de 98% este posibilă identificarea tulpinii bacteriene la nivel de specie.

Pe baza secvenței de 1447 perechi baze din secvența 16S ADNr tulpina BBG1 prezintă o asemănare de 100% cu tulpina *Rhodococcus qingshengii* djl6 (număr acces DQ090961) izolată din sol contaminată cu carbendazim (Xu et al, 2007). Tulpina BBN1 pe baza secvenței 16S ADNr (598 perechi de baze) prezintă o asemănare de 99,15% cu tulpina *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090T (număr acces Z76662).

Tabelul 3. Secvența genelor 16S ADNr ale tulpinilor BBG1 de *R. qingshengii* și BBN1 de *P. fluorescens*

Tulpina	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S ADNr
BBG1	GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCT TTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGC CCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC CTCCTATCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCC CGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACG GGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAA GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA CCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCA CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTT GTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCGTT

	<p>TGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACT TGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTA GACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCCTCCACGGAAT CCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGC ATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATAT ACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGG TGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCG TAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGT CATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCAGTACA GAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAG TTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAA TCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC CGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCTTAACC CCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGT CTA</p>
<p>BBN1</p>	<p>ACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGCAGCGGC GGACGGGTGAGTAAAGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTT CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC CTTCGGGCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGT GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGA TCAGTCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG TGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA TTAACCTAATACGTTAGTGTGTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTA ACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGA ATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAT CCCCGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACCTGACTGACTAG</p>

Secvența 16S ADNr a tulpinii BBN1 a fost depusă la NCBI, GenBank, sub numărul FR877563, secvența 16S ADNr a tulpinii BBG1 a fost depusă sub numărul de acces HE820128.

Încadrare taxonomică a tulpinii BBG1 de *Rhodococcus qingshengii* este:

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus.

Încadrare taxonomică a tulpinii BBN1 de *Pseudomonas fluorescens* este:

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas; Pseudomonas fluorescens grup; Pseudomonas fluorescens.

Determinarea capacității de biodegradare

Testarea capacității de biodegradare a tulpinilor în cazul compușilor alifatici, monoaromatici, respectiv policiclici aromatici a fost efectuată în mediul lichid de săruri minerale BBH (Bacto-Bushnell-Haas; Compoziție: MgSO₄-0,2 g; CaCl₂-0,02 g; KH₂PO₄-1 g; NH₄NO₃-1 g; FeCl₃·6H₂O-0,05 g; apă distilată-1000 ml; pH-7). Suspensia în soluție fiziologică a tulpinii BBG1, respectiv BBN1 (OD_{560nm}=0,5, cultură de 24 ore) a fost inoculată (150 μl) în mediu de testare lichid BBH (50 ml) suplimentat cu o singură hidrocarbură (1 g·l⁻¹, sterilizare prin filtrare) ca unică sursă de energie și de carbon (n-dodecană/benzen/toluen/xilen/naftalină) și cu indicator redox resazurină. Dacă în proba de testare există activitate microbiologică, are loc oxidarea hidrocarburilor, și astfel culoarea inițială – albastră - a probei se schimbă în alb prin roz (formarea resorufinei, forma redusă a resazurinei). Această schimbare a resazurinei poate fi urmărită spectrofotometric măsurând absorbanta soluției la 610 nm. Cu cât absorbanta soluției la 610 nm este mai mică, cu atât oxidarea hidrocarburilor pe cale microbiologică este mai ridicată. Soluțiile de testare au fost agitate (145 rpm) la o temperatură de incubare de 28°C timp de o săptămână. Evaluarea capacității de biodegradare a tulpinii s-a realizat pe baza absorbantei soluțiilor de testare la 610 nm (absorbanta resazurinei) folosind spectrofotometru de tip CarryWin UV-VIS Spectrophotometer (Varian). Experiența a fost repetată de trei ori.

Tabelul 4. Absorbanta soluțiilor de testare la 610 nm (±SD)

Probă analizată	Absorbanta soluției de test la 610 nm				
	Benzen	Toluen	Xilen	N-dodecană	Naftalină
Proba martor	1,089±0,001	1,098±0,002	1,09±0,001	1,084±0,002	1,089±0,001

Proba BBG1	0,961±0,003	0,967±0,003	0,969±0,005	0,923±0,006	0,971±0,001
Proba BBN1	1,028±0,003	1,059±0,004	1,064±0,004	1,035±0,006	1,042±0,003

Rezultatele testării au demonstrat faptul că tulpina BBG1 identificată ca *R. qingshengii* este capabilă să prolifereze în mediul mineral suplimentat ca unică sursă de carbon cu un singur compus mono-aromatic (benzen, toluen sau xilen), ori cu un compus policiclic aromatic (naftalină). Cea mai mare activitate a tulpinii a fost exercitată în mediul de testare suplimentată cu n-dodecană. În prezența n-dodecanei formare unui biofilm în mediul de testare a fost de asemenea observată. În urma rezultatelor privind schimbarea culorii soluției de testare, tulpina BBG1 a fost capabilă să oxideze hidrocarburile adăugate în mediu, drept semn al capacității de biodegradare. Tulpina BBN1 identificată ca *P. fluorescens* exercită o biodegradare a hidrocarburilor mult mai redusă ca tulpina BBG1 (Figura 1, Tabelul 4).

Biodegradarea hidrocarburilor petroliere de către tulpini bacteriene este posibilă datorită acțiunii enzimelor biodegradative. În descompunerea compușilor alifatici, respectiv aromatici sunt implicate diferite enzime monooxigenaze sau dioxigenaze. În biodegradarea hidrocarburilor alifactice pasul inițial al transformării este încorporarea oxigenului molecular în catena de hidrocarburi prin acțiunea enzimei de alcan-monooxigenază (*alkB*) transformând materia primă în alcool. În cazul compușilor aromatici etapa cea mai lungă, clivajul nucleului aromatic este catalizată de enzime intradiole (catechol 1,2-dioxigenază, *catA*), respectiv extradiole (catechol 2,3-dioxigenază, *C23O*). Ele catalizează clivarea nucleului aromatic fie pe cale *meta* fie pe cale *orto*. Pentru a confirma și la nivel de ADN capacitatea de biodegradare a tulpinii BBG1 a fost evidențiată prezența genelor funcționale de alcan-monooxigenază (*alkB*) și de catechol 1,2-dioxigenază (*catA*).

Pentru evidențierea genelor funcționale *alkB* și *catA* responsabile pentru expresia enzimei de alcan-monooxigenază, respectiv de catechol 1,2-dioxigenază în cazul tulpinii BBN1 s-a folosit metoda reacției de polimerizare în lanț (PCR). Reacțiile de amplificare ale genelor *C12O* și *alkB* au avut loc într-un amestec de reactivi (50 μl) care conținea soluție de tampon *DreamTaq*TM (1X) suplimentată cu MgCl₂ (2 mM), cu deoxinucleotid-trifosfați (0,2 mM fiecare dNTP), cu primeri „reverse” și „forward” (0,3

μM), 1 U de enzimă polimerază termostabilă *DreamTaq*TM DNA Polymerase (Fermentas, Lituania) și proba de ADN (1 μl).

Tabelul 5. Primeri oligonucleotidici folosiți pentru evidențierea genelor funcționale de *alkB* și *catA*

Set de primeri	Secvență nucleotidică	Gena de interes	Temperatură de anelație °C	Lungimea ampliconilor	Referință
RHO-F	5'-GCCGCCACCGACAAGTT-3'	<i>catA</i>	56	530 bp	Táncsics et al., 2008
RHO-R	5'-CACCATGAGGTGCAGGTG-3'				
RalkB-F	5'-TACTACCGGTACTGCACCTAC-3'	<i>alkB</i>	54	595 bp	Benedek et al., 2011
RalkB-R	5'-CCGTA(A/G)TG(C/T)TCGAGGTAGTT-3'				

Profilul de temperatură al reacției, pentru toate seturile de primeri s-a început cu o denaturare inițială la 95°C (3 min.), urmată de 32 cicluri de denaturare la 94°C (30 sec.), hibridizare a primerilor la temperatura reportată în Tabelul 5 (30 sec.) și elongația la 72°C (1 min.). Elongația finală a fost setată la 72°C timp de 10 minute. Amplificarea secvențelor de gene a fost efectuată cu ajutorul aparatului ABI GeneAmp[®]2700 (Applied Biosystems, USA).

Detectarea ampliconilor rezultați s-a realizat în gel de agaroză folosind metoda electroforezei. Prepararea gelului de agaroză (1%) s-a constatat în amestecarea agarozei (1 g) cu 99 ml de soluție de tampon TAE (1X) în care s-a adăugat 5 μl de bromură de etidiu (1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). După solidificarea gelului de agaroză a avut loc încărcarea godeurilor gelului cu ADN (5 μl) amestecat cu 1 μl de tampon de încărcare (6X Loading Dye Solution). La capăt de rând s-a încărcat și un marker de greutate moleculară M8 (Fermentas, Lituania). Timpul de migrare a probelor a fost de 25 de minute la o tensiune de 100 V (Figura 2).

Determinarea secvenței nucleotidice ale genelor funcționale s-a realizat prin secvențierea fragmentelor obținute prin PCR în conformitate cu metoda secvențierii genelor 16S ADNr descrisă anterior (Tabelul 6).

Studierea rezistenței față de metale grele

Rezistența tulpinilor BBG1 și BBN1 față de metale grele s-a determinat prin folosirea plăcilor de mediu nutritiv cu acizi casaminici (Difco, USA) conținând diferite concentrații (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 mM) de Pb(NO₃)₂, CuSO₄·5H₂O și ZnSO₄·7H₂O (Merck, Germany). Suprafața plăcilor a fost inoculată în puncte („spot-inoculation”) cu suspensie bacteriană (5 μl, OD₆₀₀=1). Plăcile au fost incubate la 30°C timp de două zile. Fiecare test a fost efectuată de trei ori și rezultatele au fost evaluate vizual pe baza proliferării bacteriilor pe mediul de testare în comparație cu multiplicarea culturilor bacteriene pe mediu nepoluat cu metale grele.

Tabelul 6. Secvențele nucleotidice ale genelor funcționale (*catA*, *alkB*) evidențiate

Genă de interes	Secvență nucleotidică
<i>catA</i>	TCTCGGCCATCGCCAAGGACGTGCTCGAGGCACTCGCAGGCGTCATCGA CAAGCACGGCATCACCTACCCCGAGGTACCGCGTCCTCAAGCAGTGGCT CATCGACATCGGCCAGTTCGGCGAGTGGCCCCTGTGGCTGGACGTCTTC CTCGAGCACAACGTGCGAGGAGTTGCGTACCGCGGCCAGCACGGCACC AAGGGAAGCATCGAGGGCCCGTACTACGTTGCCGATGCCAAGACGTTGC CTGCCAAGTGTGAACCTCCGATGCGTGACAACGAGGTTGGATCGAAGCT GGTCTTCGAGGGCCAGGTTCCGCGATCTCGACGGCAAGGGTTGGGCGG TGCAACCGTCGAACCTCTGGCACGCGGACGACGAAGGCTACTACTCCCAT TTCGCGCCGCACATCCCCGACGGCAACCTCCGCGGAACGATCGTCGCCG ACGACGAGGGACGCTTCGAGATCACCACGATTCAGCCTGCGCCGTACCA GATCCCGACCGACGGCCCCACCGGCTGGTTCATCGAGAAGCCGGCTGG CACCCGTGGCGTCCGGCTCACCT
<i>alkB</i>	CTGCACCTACATCTACATACCGTTCAGTTGGCCAGCCTGGTCTGGCCT GCTATCTCTGGTCGGCGACCGACCTGTCTGGCTCGGAATCGACGGGGG ACTGGGGCTGATCTCCAAGATCGGTCTGGCGATCAGTATCGGTTGCGTC GCAGGAATCGGGATCAACACCGCACACGAAGTACAGTCAACAAGAAGGACG ATCTCGAGCGCTGGTTGTCGAAGATCACTCTGGCGCAGTCGTTTTACGGC CACTTCTACATCGAGCACAATCGTGGACACCACGTGCGGGTGCACCACGC CCGAGGATCCGGCGTCGTCTCGCTTCGGCGAGAGCTTCTGGACCTTCT GCCGCGCAGTGTGTGGGGATCTCTGCGCTCGTCTGGTCCCTGGAAAAA GCCAGGCTCGATCGACTGGGTAAGAAGCCGTGGACAATTCCGAACGACG TCCTGCATTTCGTGGTTGATGTCCGTCGACTCTTCGGTGTCTCTCGTCGCC GTCTTCGGGCTCTCGGTGCTGCCGTTCTGGTGCTG

Testarea rezistenței tulpinilor BBN1 și BBG1 față de metale grele a fost efectuată împreună cu alte tulpini bacteriene izolate din solul prelevat de la Bălan. Pe baza

Tabelul 7 putem afirma că tulpina BBG1 exercită rezistența cea mai ridicată față de metalele grele investigate în concentrații relativ mari (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}), urmată de tulpina BBN1. Rezistența cea mai ridicată a tulpinii BBG1 a fost observată în cazul zincului adăugat în concentrație de 4 mM la mediul de testare. Cuprul a fost tolerat de tulpina BBG1 până la o concentrație de 3 mM, concentrațiile mai mari de cupru au inhibat proliferarea tulpinii. Pb^{2+} a fost tolerată de tulpina BBG1 până la concentrația de 3,5 mM (

Tabelul 7). Tulpina BBN1 a tolerat de asemenea concentrația maximă de 4 mM Zn^{2+} folosită. Concentrația maximă tolerată de Pb^{2+} de către tulpina BBN1 a fost de 3 mM (Tabelul 7).

Tabelul 7. Concentrația maximă tolerată a metalelor grele de către tulpinile bacteriene studiate

Tulpini testate	Concentrația maximă tolerată (mM)		
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
<i>Pseudomonas corrugata</i> BBB2	3	4	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BBN1	3,5	4	2
<i>Pseudomonas putida</i> BBN2	2	0,2	1
<i>Bacillus cereus</i> BBN12A	3	1,5	2
<i>Rhodococcus qingshengii</i> BBG1	3,5	4	3
<i>Dietzia psychrocaliphila</i> BGN5	2	0,6	1,5
<i>Pseudomonas mandelii</i> BGN9	3	0,6	2
<i>Bacillus safensis</i> BBN7	3	1,5	2

Determinarea capacității benefice ale tulpinilor bacteriene investigate asupra creșterii plantelor

Compușii de siderofori au o afinitate și specificitate crescută față de ionii de fier, având rol în solubilizarea fierului din complecși. Pentru *determinarea capacității de producere a compușilor de siderofori* de către tulpinile BBG1 și BBN1 s-a folosit mediu agarizat suplimentat cu colorantul cromazurol S. Metoda constă în detectarea compușilor de siderofori indiferent de structura lor chimică bazată pe afinitatea lor față de ionii de fier. După adăugarea unui ligand puternic (de ex. siderofor) la complexul de fier-colorant se formează un nou complex de fier-ligand, aceasta fiind urmată de

eliberarea colorantului însoțită de schimbarea culorii: în jurul coloniilor bacteriene care au capacitatea de a sintetiza siderofori, culoarea inițială albastră devenind portocaliu. În timpul aplicării metodei o suspensie de tulpini bacteriene cultivată în mediu lichid Luria Bertani (cultură de 24 de ore; compoziția mediului: bacto triptonă-10 g; bacto yeast extract (Difco)-5 g; NaCl-5 g; 5 M NaOH 1 M HCl, 1000 ml H₂O) este inoculată (5 μl) pe mediul agarizat și incubată timp de 48 de ore la 28°C. La evaluarea rezultatelor s-a luat în considerare schimbarea culorii inițială a mediului agarizat.

Pentru a determina *capacitatea de mobilizare a fosfaților anorganici din complecși insolubili* bacteriile au fost inoculate pe medii nutritive Pikovskaya (compoziție: extract de drojdie-0,5 g; dextroză-10 g; fosfat de calciu-5 g; sulfat de amoniu-0,5 g; clorură de potasiu-0,2 g; sulfat de magneziu-0,1 g; sulfat de mangan-0,0001 g; sulfat de fier-0,0001 g; agar-15 g; H₂O-1000 ml) cu un conținut de fosfat tricalcic. În timpul aplicării metodei tulpinile (cultură de 24 de ore) au fost inoculate pe mediile Pikovskaya și au fost incubate 48 ore la 28°C. În cazul unui rezultat pozitiv, în jurul bacteriilor mobilizatoare de fosfați culoarea mediului devine transparentă. Acizi organici eliberați de către microorganisme formează chelați cu cationi bivalenți de Ca²⁺ eliberând astfel fosfați din compușii insolubili de fosfați.

Determinarea capacității de *hidrolizare a carbamidei* s-a realizat în mediu nutritiv Christensen (glucoză-1 g; pepton-1 g; NaCl-5 g; KH₂PO₄-2 g; indicator roșu de fenol-0,012 g; agar-20 g; apă distilată 1000 ml). După sterilizarea mediului nutritiv s-a adăugat soluție de carbamidă (uree) sterilizată prin filtrare într-o concentrație finală de 4%. După repartiția și solidificarea mediului de cultură în eprubete s-a realizat inocularea mediilor cu tulpini bacteriene și incubarea acestora la 28°C timp de 2-3 zile. În urma capacității de hidroliză de carbamidei, producere de NH₃ este indicată de schimbarea culorii inițială galbenă a mediului în roșu.

Testul de gelatinoliză (*hidroliza gelatinei*) s-a efectuat în mediu cu gelatină repartizată în eprubete (10 ml/eprubetă). După solidificarea gelatinei în poziție verticală, mediul se însămânțează prin înțepare cu tulpinile bacteriene studiate. Culturile se așează în poziție verticală la 20-22°C. Durata incubării este de 12 zile. În acest interval de timp se urmărește creșterea bacteriilor testate și gradul de lichefiere a gelatinei la

diferite intervale de timp. Astfel, poate avea loc creștere fără lichefiere sau creșterea cu lichefiere, deosebindu-se diferite aspecte.

În urma testelor (Tabelul 8) s-a constatat că tulpina *P. fluorescens* BBN1 este capabilă de producerea de siderofori, poate mobiliza fosfați anorganici din complecși insolubili (ex. fosfat tricalcic), și este capabilă de hidrolizarea carbamidei și a gelatinei. Tulpina *R.gingshengii* BBG1 a dat rezultat pozitiv doar în cazul hidrolizei carbamidei.

Tabelul 8. Determinarea capacității benefice ale tulpinilor investigate asupra creșterii plantelor

Caracteristici benefice pentru creșterea plantelor	Tulpina investigată	
	<i>R.gingshengii</i> BBG1	<i>P. fluorescens</i> BBN1
Producerea compușilor de siderofori	-	+
Mobilizare de fosfați	-	+
Hidroliza carbamidei	+	+
Hidroliza gelatinei	-	+

Pe baza rezultatelor obținute putem afirma că bioinoculantul propus alcătuit din tulpinile *Rhodococcus qingshengii* BBG1 (număr de depozit NCAIM(P)B001401 și număr GenBank HE820128) și *Pseudomonas fluorescens* BBN1 (număr de depozit NCAIM(P)001400 și număr GenBank FR877563) poate fi folosită în bioremedierea solurilor contaminate cu hidrocarburi, respectiv cu metale grele contribuind în același timp la stimularea creșterii plantelor din interiorul zonei tratate. Luând în considerare capacitatea tulpinii BBG1 de a biodegrada poluanți organici și de a tolera prezența metalelor grele (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}), tulpina BBG1 este considerată ca membrul bioinoculantului propus destinat de a elimina hidrocarburile (poluanți alifatici, aromatici și policiclici aromatici) din mediu. Tulpina BBN1 datorită capacității ei de a rezista în prezența metalelor grele, de a produce compuși siderofori și de a mobiliza fosfor este considerată un factor important al bioinoculantului cel care sechestrează metale grele și exercită proprietăți benefice asupra creșterii plantelor.

Bioinoculantul reprezintă o soluție alternativă pentru remedierea terenurilor contaminate cu hidrocarburi.

Revendicare

1. Consorțiul microbial caracterizat prin aceea că este alcătuit din tulpinile BBG1 de *Rhodococcus qingshengii* și BBN1 de *Pseudomonas fluorescens*, înregistrate la NCAIM (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms) din Budapesta, cu numerele de înregistrare NCAIM(P)B001401, respectiv NCAIM(P)001400, având capacitatea de a biodegrada hidrocarburi alifatiche (n-dodecană), mono-aromatice (benzen, toluen, xilen) și aromatice policiclice (naftalină), (ii) prin rezistența crescută față de metale grele (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) și (iii) prin exercitarea unor proprietăți benefice asupra dezvoltării plantelor (producerea de siderofori, mobilizarea fosfaților anorganici din complecși insolubili, hidrolizarea carbamide și a gelatinei), este adecvat pentru remedierea biologică a solurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere, chiar și în prezența unor metale grele, contribuind în același timp și la dezvoltarea plantelor.

1.1 Conform revendicării nr. 1. Tulpina *Rhodococcus qingshengii* BBG1 caracterizată prin aceea că are capacitatea de a degrada n-dodecană, benzen, toluen, xilen, naftalină, fapt susținut prin evidențierea genelor funcționale *alkB*, *catA* responsabile în catalizarea procesului de descompunere, și prin faptul că tulpina se poate înmulți în mediu de cultură care are ca unică sursă de carbon n-dodecană, benzen, toluen, xilen sau naftalină.

1.2 Conform revendicării nr. 1 Tulpina *Rhodococcus qingshengii* BBG1 caracterizată prin aceea că tolerează prezența unor metale grele în concentrații ridicate, demonstrat prin faptul că tulpina se poate înmulți în mediu de cultură care conține o concentrație maximă de Pb^{2+} de 3,5 mM; Zn^{2+} de 4 mM; Cu^{2+} de 3 mM.

1.3 Conform revendicării nr. 1. Tulpina *Pseudomonas fluorescens* BBN1 caracterizată prin aceea că tolerează prezența unor metale grele în concentrații ridicate, demonstrat prin faptul că tulpina se poate înmulți în mediu de cultură care conține o concentrație maximă de Pb^{2+} de 3,5 mM; Zn^{2+} de 4 mM; Cu^{2+} de 2 mM.

1.4 Conform revendicării nr. 1 Tulpina *Pseudomonas fluorescens* BBN1 caracterizată prin aceea că are capacități benefice asupra creșterii plantelor, prin producerea de siderofori, mobilizarea fosfaților anorganici din complecși insolubili, hidrolizarea carbamide și a gelatinei.

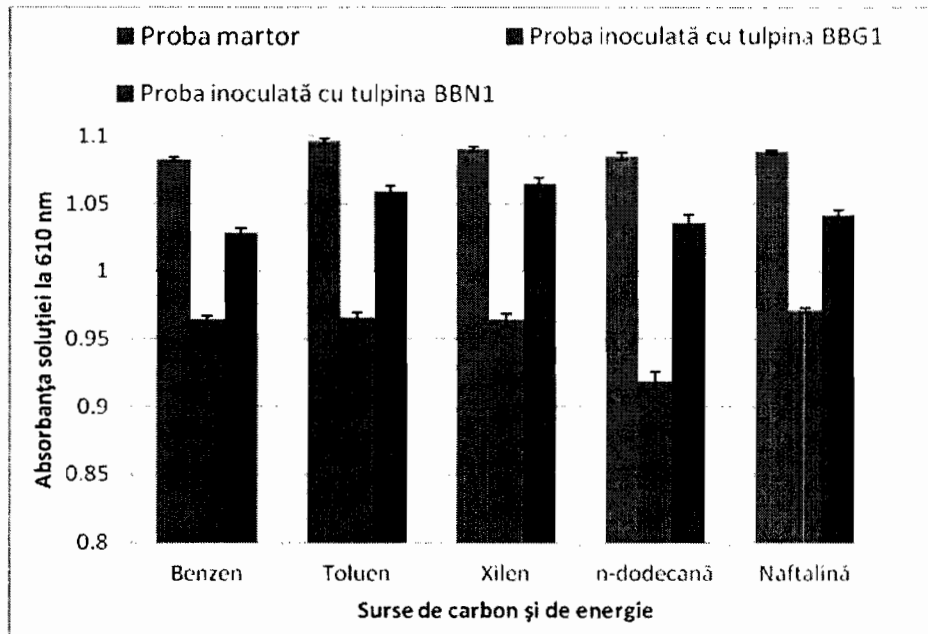


Figura 1. Capacitatea de biodegradare a tulpinilor BBN1 și BBG1 evaluată pe baza rezultatelor obținute după testarea tulpinilor în medii minerale BBH suplimentate cu surse unice de carbon (benzen/toluen/xilen/n-dodecană/naftalină)

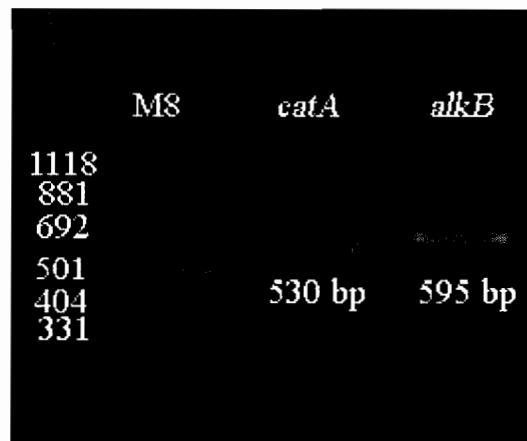


Figura 2. Evidențierea genelor funcționale *catA* respective *alkB* în cazul tulpinii *R. qingshengii* BBG1