



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00419

(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:
• SZENTES SAROLTA, STR. LUNCA MARE
NR. 22, SC. A, AP. 4, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• MARA GYONGYVER, PIAȚA LIBERTĂȚII
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• GYORGY EVA, STR.TOPLIȚA NR.50,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;

• MATHE ISTVAN,
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• ABRAHAM BEATA, STR. CULMEI BL.11,
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LASLO EVA, BD. FRĂȚIEI NR. 2, SC. E,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LANYI SZABOLCS ȘTEFAN, 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) **BIOPREPARAT CU EFECT ÎMPOTRIVA
MICROORGANISMELOR PATOGENE ALE PLANTELOR ȘI
PROCEDEU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un biopreparat microbial, folosit ca biopesticid cu spectru larg împotriva microorganismelor fitopatogene, cu aplicare pe sămânță, pe plantulă sau pe sol, constituit din două tulpini bacteriene, și la un procedeu de obținere a acestuia. Biopreparatul microbial conform invenției este constituit din tulpina *Serratia fonticola* B17 (număr de depozit NCAIM Ș(P) B 001399) și tulpina *Pseudomonas fluorescens* E8 (număr de depozit NCAIM (P) B 00198), izolate din țesuturile unor briofite autohtone, asociate în raport gravimetric de 1:1. Procedeu de obținere a

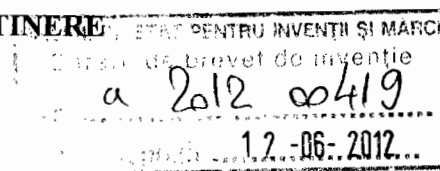
biopreparatului constă în aceea că acesta cuprinde obținerea unui inocul prin cultivarea tulpinilor *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas fluorescens* E8 pe medii care conțin zaharoză, ca sursă de carbon, făină de soia, ca sursă de azot, și săruri minerale, la o temperatură de 28°C, timp de 24 h, cu agitare, și amestecarea celor două biomase obținute, în raport gravimetric de 1:1.

Revendicări: 2
Figuri: 4



BIOPREPARAT CU EFECT ÎMPOTRIVA MICROORGANISMELOR PATOGENE

AI PLANTELOR SI PROCEDEU DE OBTINERE



Prezenta invenție se referă la un biopreparat microbial compus din două tulpini bacteriene, folosit ca biopesticid în agricultura modernă, și la procedeul de obținere acestuia.

Bacteriile/rhizobacteriile favorizante ale creșterii plantelor (PGPR-Plant Growth Promoting Rhizobacteria) respectiv bacteriile de control biologic (BCAs – Biocontrol Agents) controlează efectul dăunător al agenților fitopatogeni prin diferite mecanisme ca secretarea enzimelor și antibioticelor care inhibă creșterea patogenilor.

Sintetizarea antibioticelor este una dintre cele mai importante mecanisme în urma căruia activitățile bacteriilor fitopatogene sunt inhibitate. Cele mai cunoscute substanțe antibiotice sunt: agrocin 84, agrocin 434, oomicină, fenazină, 2,4 diacetil-floroglucinol (DAPG), serracină P, pyrrolnitrina (Glick și Bashan 1997, Bangera și Thomashow 1999).

Biopesticidele sunt biopreparate pe bază de bacterii biocontrol. Avantajul biopesticidelor este că reprezintă o soluție alternativă față de pesticidele chimice în agricultura durabilă (Copping și Menn 2000). După Elsas și colab (2006) biopesticidele asigură controlul bolilor cauzate de fitopatogene care nu sunt dăunătoare asupra mediului. În biopesticidele comercializate mai ales două specii bacteriene sunt folosite: *Pseudomonas sp.* și *Bacillus sp.*, deoarece tulpinile bacteriene aparținând acestor specii, sunt foarte ușor de izolat și menținut, cu proprietăți necesare pentru a le folosi ca pesticide alternative.

Aceste biopreparate au dezavantajul că nu prezintă efectele scontate datorită condițiilor climatice și caracteristicilor abiotice prezentate de tipurile de sol formate în regiuni vulcanice.

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unui biopreparat compus din bacterii cu rol în combaterea agenților fitopatogeni.

Biopreparatul microbial conform invenției este constituit din tulpina *Serratia fonticola B17* și tulpina *Pseudomonas fluorescens E8*, cu spectru larg de acțiune împotriva atacului a numeroaselor microorganisme fitopatogene.

Cele două tulpini *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* conform invenției sunt depuse la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numere de depozit NCAIM (P) B 001399 și NCAIM (P) B 001398.

Procedeu de obținere a unui biopreparat cu rol de biocontrol cu ajutorul tulpinilor bacteriene *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* izolate din țesuturile unor briofite autohtone conform invenției, constă în aceea că, cuprinde obținerea unui inocul, prin cultivarea tulpinilor *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* pe medii care conțin zaharoză ca sursa de carbon, făina de soia ca surse de azot și săruri minerale la o temperatură de 28°C timp de 24 h cu agitare, amestecarea celor două biomase obținute în raport gravimetric de 1:1, care se aplică pe sămânța sau plantula sau sol.

Prin realizarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- efect biocontrol
- tulpinile bacteriene care stau la baza biopreparatului cu efect împotriva microorganismelor fitopatogene sunt tulpini bacteriene autohtone
- spectru larg de acțiune împotriva microorganismelor fitopatogene
- are rol în protecția plantelor împotriva microorganismelor patogene
- bacteriile sunt ușor cultivabile, se multiplică rapid
- procedeul de realizare a biopreparatului microbial cu efect biocontrol este simplu și ușor realizat

Tulpinile bacteriene *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* folosite în procesul biotehnologic sunt izolate din țesuturile unor briofite autohtone și caracterizate genetic prin identificare.

Biopreparatul microbial cu efect biocontrol s-a obținut cu un amestec de tulpini microbiene și anume tulpina bacteriană *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* originare din țesuturile respectiv rizosfera unor briofite.

Pentru mediile de cultivare, s-au folosit ca surse de carbon: zaharoza, ca surse de azot: făina de soia. În afara de aceste materii prime, s-au folosit și săruri minerale care conțin potasiu și fosfor.

Efectul biopreparatului biopesticid obținut s-a studiat in vitro la plante de grâu, cu rezultate bune în ceea ce privește caracterele antagoniste și promovarea creșterii plantelor de grâu.

Procedeu de obținere prin biosinteza a biopreparatelor microbial conform invenției constă în următoarele:

- În prima fază se obține cultura de preinocul prin cultivarea în flacon de agitare a tulpinilor bacteriene *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* pe medii

proprii tulpinilor. Mediul nutritiv conține ca surse de carbon: zaharoză, ca sursă de azot: făină de soia și săruri minerale.

- Dezvoltarea tulpinilor de microorganisme are loc la temperatura de 28°C, timp de 24 h.
- Faza de inocul are loc în aceleași condiții ca preinoculul sau, la un volum mai mare de mediu de cultura.
- În faza de bioproces are loc dezvoltarea și cultivarea tulpinilor bacteriene, utilizând o medie de cultivare diferită ca la inocul.
- Mediile de cultură și condițiile de lucru sunt aceleași la tulpinile bacteriene utilizate *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8*.
- Pentru obținerea biomasei tulpinilor *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* temperatura de incubare este 28 °C timp de 24 h și agitare 200 rpm (rotații pe minut), amestecarea celor două biomase obținute în raport gravimetric de 1:1, care se aplică pe samanta sau plantula sau sol.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

Faza 1. Izolarea și identificarea bacteriilor benefice

Serratia fonticola B17 NCAIM (P) B 001399

Pentru izolarea tulpinii bacteriene *Serratia fonticola B17* s-a prelevat probe din rezervația naturală Mlaștina Borsáros din țesuturile briofitelor - *Bryophyta*, 50 mg de țesut de briofite se dizolvă în 10 ml de ser fiziologic, soluție de NaCl 0,9 %. Din această soluție se transferă 1 ml în 9 ml de ser fiziologic, obținând diluția 10^{-1} . Din această soluție se transferă din nou 1 ml în 9 ml de ser fiziologic, obținând diluția 10^{-2} . Din fiecare diluție se transferă 0,1 ml în medii de cultură selective. Probele se incubează 24 ore, la 28 °C. Mediul de cultură folosit este următoarea: MacConkey: hidrolizat pancreatic de gelatină 17 g, digestie pancreatică de cazeină și digestie pepsică de țesut animal 3 g, lactoză 10 g, săruri biliare 1,5 g, NaCl 5 g, roșu neutru 20 mg, cristal violet 1 mg, agar-agar 13,5 g, apă distilată 1000 ml.

După obținerea culturilor pure, acestea au fost păstrate pe mediu Nutrient (peptonă 5 g, NaCl 5 g, extract de drojdie 2 g, extract de carne 1 g, agar-agar 15 g, apă distilată 1000 ml.

Pseudomonas fluorescens E8 NCAIM (P) B 001398

Pentru izolarea tulpinii bacteriene *Pseudomonas fluorescens E8* am propus prelevarea probelor din rezervația naturală Mlaștina Borsáros din rizosfera briofitelor - *Bryophyta*, 50 mg de rizosferă se dizolvă în 10 ml de ser fiziologic, soluție de NaCl 0,9 %. Din această soluție

se transferă 1 ml în 9 ml de ser fiziologic, obținând diluția 10^{-1} . Din această soluție se transferă din nou 1 ml în 9 ml de ser fiziologic, obținând diluția 10^{-2} . Din fiecare diluție se transferă 0,1 ml în medii de cultură selective. Probele se incubează 24 ore, la 28 °C. Mediul de cultură folosit este următoarea: King's B: proteoza peptonă 2 g, glicerol 10 ml, K_2HPO_4 1,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, agar-agar 15 g, apă distilată 1000 ml, după obținerea culturilor pure, acestea au fost păstrate pe mediu Nutrient.

Caracterele morfologice și biochimice a celor două tulpini bacteriene izolate sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1. Caracterele morfologice și biochimice a tulpinilor bacteriene *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas fluorescens* E8

	<i>Serratia fonticola</i> B17 NCAIM (P) B 001399	<i>Pseudomonas fluorescens</i> E8 NCAIM (P) B 001398
Colorația Gram	-	-
Evidențierea sp.lor	-	-
Oxidarea glucozei	+	+
Oxidarea lactozei	-	-
Reducerea nitraților	+	-
Testul gelatinoliză	+	-
Tipul respirației	aerobă	aerobă

În vederea încadrării taxonomice tulpinile *Pseudomonas fluorescens* E8 și *Serratia fonticola* B17 au fost caracterizate pe baza secvenței 16S ADN ribosomal. Secvența 16S rADN a ADN-ului genomic, a fost amplificat prin reacție în lanț a polimerazei (PCR) folosind primerii 27f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') și 1492r (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'). Identificarea tulpinilor bacteriene s-a realizat prin secvențiere.

Secvențele obținute au fost analizate folosind programul MEGA5. Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene NCBI (National Centre for Biotechnology Information), s-a realizat cu ajutorul programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Dacă similaritatea secvențelor 16S rADN ale tulpinilor bacteriene studiate cu secvențele existente în banca de gene este mai mare de 98%, atunci tulpinile pot fi identificate până la nivel de specie. În Tabelul 2. sunt prezentate rezultatele secvențierii.

Tabel 2. Secvențele obținute pe baza analizei a primelor 500 de perechi de baze ai secvenței 16S rADN.

Tulpina	Lungime a secvenței 16S rADN (perechi)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinilor pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile de referințe din GenBank; procentul de similaritate

	de baze)		
<i>Serratia fonticola</i> B17	396	CCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCG AAGGCCITCTTCACACACGCGGCATGGCTGCAT CAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTG CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGT TCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTA GGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACC TACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGG TGTGAGGCCCGAAGGTCCCCACTTTGGTCCGA AGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTA GTTATCCCCCTCCATCGGGCAGNTTCCCAGACAT TACTACCCCGTCCGCCGCTCGTCAACCAGGAGC AAGCTCCNTGTGCTACCGCTCGACGTG	<i>Serratia fonticola</i> DSM 4576 (AJ233429) - similaritate: 99,8%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> E8	469	AAACAATCACGTATTAGGTAAGTGCCTTCCTCC CAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCT TCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTTCG CCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG TAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG ACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGT AGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCT AATCCGACCTAGGCTCATCTAATAGCGTGAGGT CCGAAGATCCCCACTTTCTCCCGTAGGACGTAT GCGGTATTAGCGCCCGTTTCCGGACGTTATCCCC CACTACTAGGCAGATTCCCTAGGCATTACTCACC CGTCCGCCGCTCGCCACCAGGTACAAGTACCCG TGCTGCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCC GCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGGATCAAATC A	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WSM3457 (JF423119) - similaritate: 99,1%

Faza 2: Determinarea producerii sideroforilor

Determinarea capacității de producere a compușilor siderofori s-a realizat într-un mediu agarizat cu conținut de colorant de crom-azurol S (CAS). Metoda are la bază, faptul că compușii de siderofori datorită afinității lor pentru ionii de fier pot fi detectate indiferent de structura lor chimică. La complexul de fier-colorant este adăugat un ligand puternic de exemplu compuși siderofori. După formarea complexului de fier-ligand, eliberarea colorantului este însoțită de schimbarea culorii. În jurul coloniilor bacteriene dezvoltate cu capacitate de producere de siderofori, culoarea albastru devine portocaliu. 10 μl din tulpinile bacteriene de 24 h, cultivate în mediu lichid Nutrient sunt inoculate pe mediu CAS agarizat (6 g PIPES, 0,6 g NaOH, 15 g proteoza peptonă, 15 g MgSO₄*7H₂O, 1,5 g K₂HPO₄, 10 ml glicerol, 60,5 mg crom-azurol S în 50 ml de apă distilată, 10 mg FeCl₃*6H₂O și 72,9 mg HDTMA în 50 ml de apă distilată, apă distilată 900 ml) și incubate 48 ore la 28 °C.

Cele două tulpini bacteriene studiate au dat rezultat pozitiv din punct de vedere a producerii sideroforilor.

Faza 3: Producerea de cianură de hidrogen

Din tulpinile de testat se obțin culturi de 24 ore în mediu lichid Nutrient. 0,1 ml din cultura bacteriană se transferă în mediu agarizat Nutrient suplimentat cu glicină (4,4 g/l). O bucată de

hârtie filtru steril (așezat mai întâi într-o soluție de 0,5 % acid picric în 2% Na₂CO₃) se așează în fundul părții de acoperire a plăcilor Petri. Plăcile inoculate închise cu parafilm, se incubează timp de 4 zile, la 28 °C. Schimbarea culorii hârtiei de filtru din culoarea galbenă în portocaliu sau maro indică producerea cianurii de hidrogen.

Tulpinile bacteriene *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas fluorescens* E8 au avut capacitatea de a produce cianură de hidrogen.

Faza 4: Antagonism împotriva tulpinii bacteriene Erwinia carotovora

Specia bacteriană *Erwinia carotovora* a fost însămânțată în mediu Nutrient lichid și incubată timp de 24 ore la 28 °C și 150 rpm, într-un incubator cu agitare. Din cultura bacteriană se obține o suspensie în ser fiziologic steril, ca densitatea optică (OD) la 660 nm să fie 0,3. Din suspensia astfel obținută 1 ml este amestecată cu mediu Nutrient agarizat (40-50 °C), adăugând 1 ml de 1% TTC (clorură de trifenil-tetrazoliu) la fiecare 100 ml de mediu. În acest mediu solidificat se fac găuri în care se pipetează 100 μl din supernatantul bacteriilor izolate obținut prin metoda descrisă de mai jos.

Culturile bacteriene se obțin în mediu Nutrient lichid, incubat timp de 5 zile, la 28 °C și 150 rpm. După incubare o cantitate de 1,5 ml din culturile crescute sunt centrifugate la 12000 rpm timp de 30 minute. Microorganismele vii pot reduce clorura de trifenil-terazoliu, astfel culoarea mediului nutritiv devine roșcată. Supernatantul se difundă în găurile mediului nutritiv, iar dacă în supernatant este prezent un agent antimicrobial, creșterea speciei bacteriene prezent în mediul agarizat este inhibat, deci culoarea mediului nutritiv nu se schimbă.

Plăcile sunt incubate timp de 24 ore, după care se poate face analiza de inhibiție. Testul de antibioză a fost repetată de 5 ori.

Dintre cele două tulpini bacteriene studiate *Serratia fonticola* B17 s-a demonstrat a fi mai eficient împotriva speciei bacteriene fitopatogene, zona de inhibiție fiind 9,4 mm. În cazul tulpinii *Pseudomonas fluorescens* E8 zona de inhibiție a fost 2,4 mm (Tabel 3.).

Tabel 3. Testarea in vitro a activității antagoniste a tulpinilor de *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas fluorescens* E8 asupra creșterii tulpinii bacteriene *Erwinia carotovora*

	Zona de inhibiție indusă de tulpina B17 (mm)	Zona de inhibiție indusă de tulpina E8 (mm)
<i>Erwinia carotovora</i>	9,4	2,4

Exemplul 5: Antagonism împotriva speciilor fungice patogene: Fusarium oxysporum și Alternaria alternata

Speciile fungice se însămânțează pe suprafața mediului nutritiv Complex (peptonă 10 g, glucoză 40 g, extract de drojdie 10 g, agar-agar 20 g, apă distilată 1000 ml) prin striere. După însămânțare, în mediu se fac găuri, în care se pipetează 100 µl din supernatantul bacteriilor izolate obținut prin metoda descrisă de mai jos.

Culturile bacteriene se obțin în mediu Nutrient lichid, incubat timp de 5 zile, la 28 °C și 150 rpm. După incubare o cantitate de 1,5 ml din culturile crescute sunt centrifugate la 12000 rpm timp de 30 minute.

Plăcile sunt incubate timp de 5 zile, după care se poate face analiza de inhibiție. Testul de antibioză a fost repetată de 5 ori. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.

Tabel 4. Testarea in vitro a activității antagoniste a tulpinilor de *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas fluorescens* E8 asupra creșterii miceliene a unor fungi fitopatogene

	Zona de inhibiție indusă de tulpina B17 (mm)	Zona de inhibiție indusă de tulpina E8 (mm)
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,4	1
<i>Alternaria alternata</i>	1,8	1,6

Faza 6: Obținerea biopreparatelor la scară de laborator, determinarea ratelor de creștere

Pentru obținerea preparatului, tulpinile bacteriene au fost crescute în mediu nutritiv agarizat (Nutrient agar), timp de 24 ore, la 28°C. În cazul fiecărei tulpini bacteriene s-a făcut o suspensie de bază, folosind soluție fiziologică sterilă. Numărul din aceste suspensii a fost setată la 10⁸ unități formatoare de colonii – UFC/ml, cu ajutorul aparatului de măsurare a densității optice tip BIOLOG. 250 µl din suspensia astfel obținută a fost folosită pentru inocularea unui volum de 20 ml de mediu nutritiv industrial. Cultura a fost crescută, timp de 24 ore, la 28°C, cu agitare la 250 rpm. Mediul nutritiv industrial conține următoarele substanțe: făină de soia 25 g, K₂HPO₄ 1,25 g, zaharoză 1,25 g, apă distilată 1000 ml, sterilizat la 121 °C, 20 minute. Cultura astfel obținută a fost folosit în continuare, pentru inocularea unui volum de 1 l de mediu nutritiv industrial (12,5 ml la 1 l de mediu). Cultura a fost crescută într-un sistem fermentator de laborator tip Biostat A Plus (Sartorius) timp de 24 ore, parametrii de proces fiind următoarele: 28° C, cu agitare de 200 RPM, presiunea parțială a oxigenului dizolvat constantă la 50%, pH 7,3 (folosindu-se 5% NaOH și 5% H₂SO₄ pentru controlul pH). Probe de câte 5 ml au fost luate în fiecare 4 ore. Pentru determinarea numărului de unități formatoare de colonii, din fiecare probă au fost preparate diluții zecimale seriale (între 10⁻¹ și 10⁻⁸). Din fiecare diluție 0,1 ml au fost însămânțate pe mediu de cultură

agarizat în cutii de Petri. În cazul fiecărei însămânțări s-au efectuat câte două repetiții. După 24-48 ore de incubare la 28 °C, s-au numărat coloniile bacteriene, cu ajutorul numărătorului de colonii Scienceware Mini Light Box. În cazul fiecărei suspensii bacteriene s-a calculat valoarea medie a CFU/ml (Tabel 5., Tabel 6.).

Tabel 5. Caracteristicile tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17

Punct de măsură		0	4	8	12	16	24
CFU/ml (<i>Serratia fonticola</i> B17 NCAIM (P)B001399)	Diluție	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Nr. de colonii	48	56	222	183	72	59
	CFU/ml (*10 ¹⁰)	0,0048	0,056	0,222	1,83	0,72	0,59

Tabel 6. Caracteristicile tulpinii bacteriene *Pseudomonas fluorescens* E8

Punct de măsură		0	4	8	12	14	24
CFU/ml (<i>Pseudomonas fluorescens</i> E8 NCAIM (P)B001398)	Diluție	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶ /10 ⁻⁷	10 ⁻⁶ /10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
	Nr. de colonii	108	214	277,5	211/37,5	276,5/32	190,5
	CFU/ml (*10 ⁹)	0,108	0,214	2,775	2,93	2,98	1,905

Faza 7: Testarea în laborator a efectelor antagoniste a speciilor bacteriene

Eficacitatea tulpinilor bacteriene *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas fluorescens* E8 împotriva speciei fungice *Fusarium oxysporum* a fost testată pe plante de grâu, în condiții de laborator, într-un fitotron. Specia fungică *Fusarium oxysporum*, a fost crescută timp de 5 zile, la 28 °C, 250 RPM, în mediu Complex (glucoză 40 g, peptonă 10 g, extract de drojdie 10 g, agar-agar 20 g, apă distilată 1000 ml). Numărarea conidiilor a fost efectuată cu un hemocitometru Thoma.

Solul folosit a fost sterilizat, la 105 °C, timp de 30 minute, repetată de trei ori, în trei zi consecutive. Solul a fost inoculat cu suspensia fungică, astfel încât numărul conidiilor să fie între 10⁴-10⁵/g sol. După inocularea solului cu specia fungică, am adăugat și suspensia bacteriană (într-o concentrație de 10⁷ unități formatoare de colonii - UFC/g sol). Am folosit și o probă martor, reprezentat de un mediu inoculat doar cu suspensia fungică, fără tratare bacteriană.

Semințele de grâu au fost sterilizate într-o soluție de hipoclorit concentrat, timp de 30 de minute, după care au fost spălate cu apă distilată. Germinarea s-a efectuat timp de 3 zile, iar plănuțele germinate au fost însămânțate. În cazul fiecărei însămânțări s-a efectuat câte 20 de

repetiții. Plantele de grâu au fost crescute timp de 25 zile, într-o cameră climatizată (25 °C, 70% umiditate relativă, durata perioadei de iluminare fiind 12 ore/zi).

Experimentul a fost analizat în ceea ce privește eficacitatea tulpinilor în combaterea speciei fitopatogene, respectiv s-a determinat creșterea plantelor prin măsurarea greutateii și lungimii totale a tulpinii și rădăcinii.

Eficacitatea arată capacitatea de protecție a tulpinilor studiate față de patogenul *Fusarium oxysporum* în condiții de laborator. În cazul calculului eficacității am analizat plantele sănătoase răsărite în față de cele nesănătoase. Tulpina bacteriană *Serratia fonticola B17* s-a dovedit a fi mai eficient în combaterea fitopatogenei *Fusarium oxysporum*, pe plante de grâu, procentul de eficacitate fiind 85%. În Tabelul 7. sunt prezentate eficacitatea diferitelor tulpini bacteriene în combaterea tulpinii fungice patogene *Fusarium oxysporum* în condiții de laborator.

Tabel 7. Eficacitate tulpinilor bacteriene *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* împotriva tulpinii fungice *Fusarium oxysporum*

Specia bacteriană	Plante sănătoase răsărite	Procentul plantelor sănătoase	Eficacitate (%)
<i>Serratia fonticola B17</i>	17	85	20
<i>Pseudomonas fluorescens E8</i>	16	80	15
Martor	13	65	-

Tulpina bacteriană *Pseudomonas fluorescens E8* a avut cea mai mare influență asupra creșterii plantelor de grâu, în solul infectat cu *Fusarium oxysporum*. Lungimea totală a plantelor (vezi Tabelul 8.) a fost influențată de tratamentele biologice cu inoculanții bacteriene, valori semnificative prezentate doar în cazul tratării cu specia bacteriană *Pseudomonas fluorescens E8* (Fig.3). În Figura 4. este prezentată variația greutateii biomasei plantelor de grâu.

Tabel 8. Lungimea și greutatea plantelor de grâu sub influența tratamentelor biologice cu inoculanți bacterieni

	Lungimea totală (cm)	Greutatea proaspătă (g)			Greutate uscată (g)		
		Tulpină	Rădăcină	Gr. totală	Tulpină	Rădăcină	Gr. totală
<i>Pseudomonas fluorescens E8</i>	26,12	0,066	0,038	0,097	0,051	0,017	0,069
<i>Serratia fonticola B17</i>	21,46	0,101	0,05	0,105	0,055	0,014	0,066
Martor	21,67	0,063	0,025	0,086	0,043	0,015	0,058

În concluzie cele două tulpini bacteriene studiate s-au dovedit de a avea calități de combatere biologică față de următoarele patogeni ai plantelor: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* și *Erwinia carotovora*. De asemenea cele două tulpini produc substanțe cu efecte antibiotice: siderofori și cianură de hidrogen are un rol important în inhibarea fitopatogenelor. Biopreparatul obținut prin amestecarea celor doua biomase obținute in raport gravimetric de 1:1, ca bioinoculant reprezintă o soluție alternativă în înlocuirea parțială a pesticidelor folosite ,care se aplica pe samanta plantula sau sol în combaterea fitopatogenelor.

REVENDICARI

1. Biopreparatul cu efect impotriva microorganismelor fitopatogene caracterizat prin aceea ca este compus din tulpina *Serratia fonticola B17* si *Pseudomonas fluorescens E8*, sunt depuse la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numere de depozit NCAIM (P) B 001399 și NCAIM (P) B 001398, avand capacitatea de a inhiba cresterea agentilor fitopatogeni.

1.1 Conform revendicarii 1 tulpina *Serratia fonticola B17* caracterizata prin aceea ca are capacitate de producerea de siderofori si a metabolitului secundar cianura de hidrogen, prezinta antagonism impotriva bacteriei fitopatogene *Erwinia carotovora* si speciilor fungice patogene *Fusarium oxysporum* si *Alternaria alternata*.

1.2 Conform revendicarii 1 tulpina *Pseudomonas fluorescens E8* caracterizata prin aceea ca are capacitate de producere de siderofori si a metabolitului secundar cianura de hidrogen, prezinta antagonism impotriva bacteriei fitopatogene *Erwinia carotovora* si speciilor fungice patogene *Fusarium oxysporum* si *Alternaria alternata*.

2. Procedeu de obtinere a biopreparatului cu efect impotriva microorganismelor fitopatogene caracterizat prin aceea ca cuprinde obtinerea unui inocul, prin cultivarea tulpinilor *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas fluorescens E8* pe medii care conțin zaharoză ca sursa de carbon, făina de soia ca surse de azot si săruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare, amestecarea celor două biomase obținute in raport gravimetric de 1:1, care se aplica pe sămânța, sau plantula sau sol.

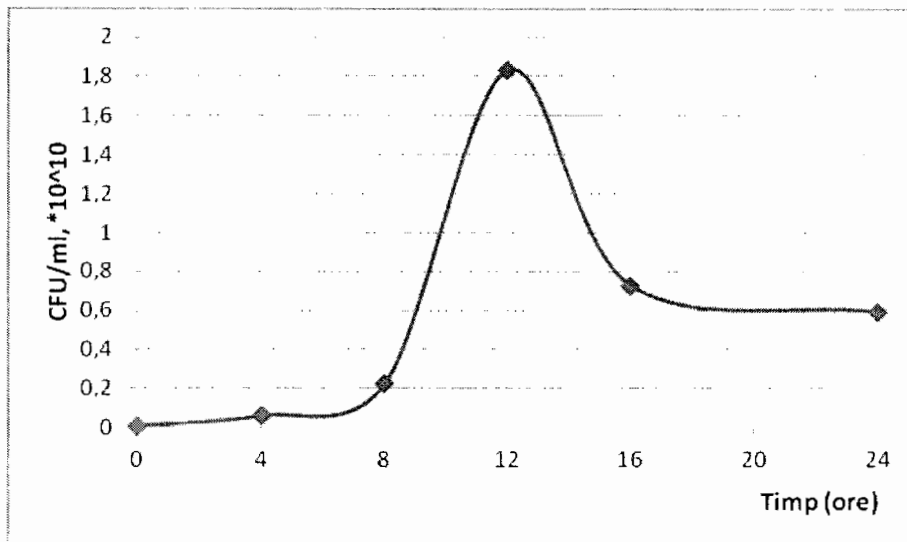


Figura 1. Reprezentare grafică a numărului unităților formatoare de colonii, din cultura bacteriană *Serratia fonticola B17*

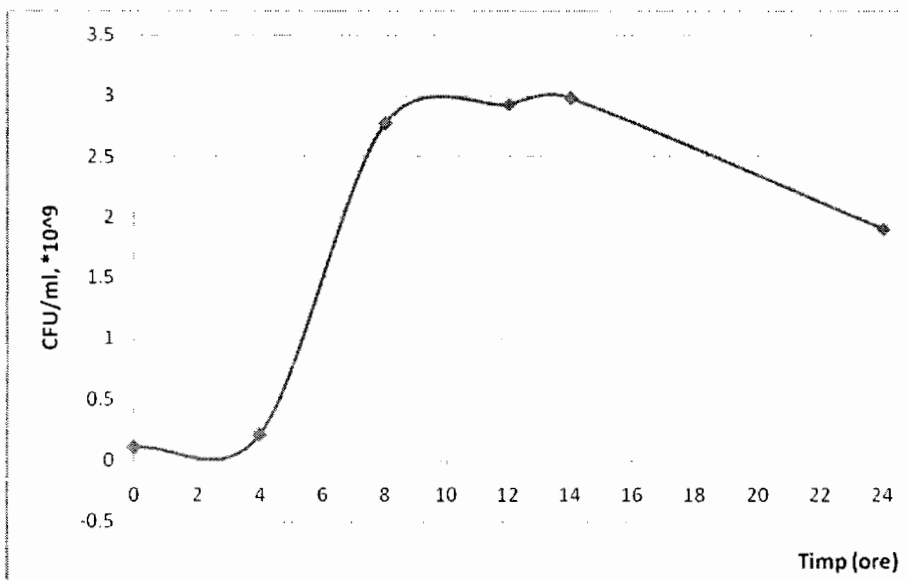


Figura 2. Reprezentare grafică a numărului unităților formatoare de colonii, din cultura bacteriană *Pseudomonas fluorescens E8*

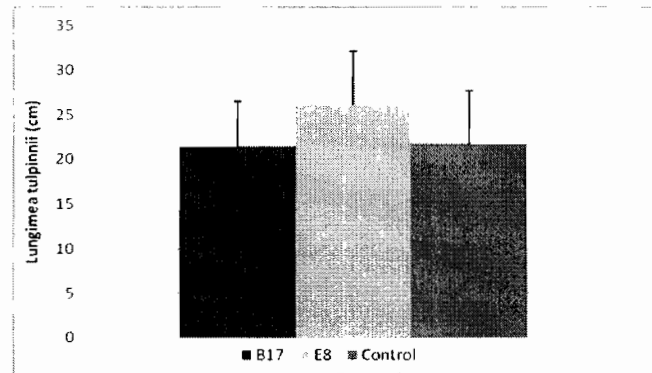


Figura 3. Reprezentarea schimbării a lungimea tulpinilor de grâu în cazul tratării și netratării cu inoculant bacterian.

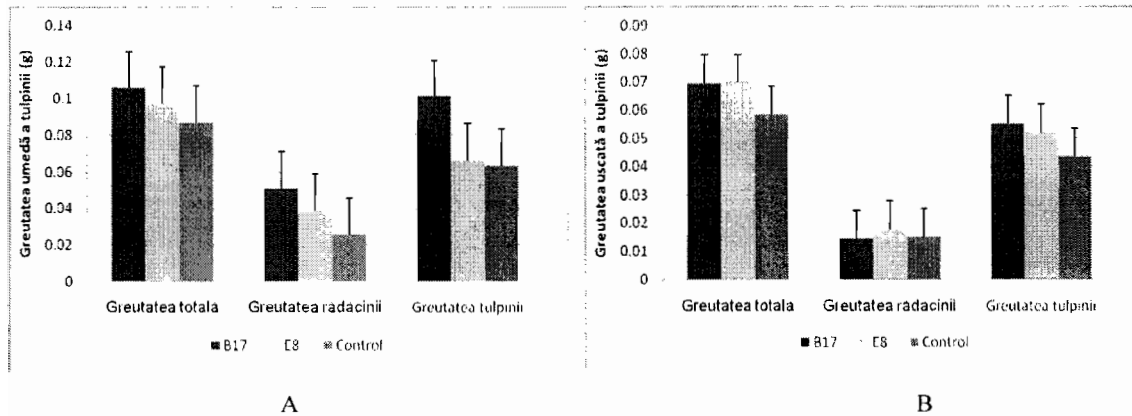


Figura 4. Greutatea proaspătă (A) și uscată (B) a tulpinii plantelor martor și a celor tratate cu specii bacteriene studiate