



(11) **RO 131932 B1**

(51) **Int.Cl.**

C05F 11/08 (2006.01);
C12N 1/00 (2006.01);
C12R 1/08 (2006.01);
C12R 1/885 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00943**

(22) Data de depozit: **02/12/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2019** BOPI nr. **11/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA 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;**
• **ARSENÉ MELANIA LILIANA, STR. COZLA
NR.8, BL.A7, SC.4, AP.49, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPESCU MARIANA, STR. VALEA ROȘIE
NR. 6, BL. 62, SC. C, ET. 1, AP. 35,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CN 101412641 B; RO 122676 B1;
RO 128931 A0; RO 131177 A2**

(54) **CONSORTIU DE MICROORGANISME PENTRU STIMULAREA
CREȘTERII PLANTELOR**



RO 131932 B1

1 Prezenta invenție se referă la un consorțiu de microorganisme benefice plantelor de
cultură, pe bază de *Trichoderma* și *Brevibacillus*, având activitate de biostimulare a plantelor
3 datorită eliberării controlate a biosiliciului din resturile vegetale, și este utilizat în special în
tratamentele aplicate sistemelor de agricultură conservativă.

5 Sunt cunoscute diferite consorții de microorganisme benefice plantelor de cultură, iar
printre cele revendicate mai des sunt cele constituite din tulpini aparținând genului
7 *Trichoderma* și grupului bacteriilor gram-pozitive endo-sporulante. Inițial tulpinile din aceste
genuri au fost asociate pentru a obține un efect superior de combatere a bolilor plantelor,
9 amândouă grupurile de microorganisme fiind recunoscute pentru tulpinile care au activitate
antagonistă.

11 Brevetul **CN 101412641 B** se referă la un preparat microbial pe bază de
Trichoderma sp. CGMCC No. 2744 și *Brevibacillus sp.* CGMCC No. 2747, utilizat pentru
13 îmbunătățirea structurii și fertilității solului.

Brevetul **RO 122676 B1** se referă la un procedeu de obținere a unor produse biologice
15 active, cu rol de fertilizare, biostimulare și antagonism microbial, și presupune utilizarea
tulpinilor bacteriene de *Bacillus subtilis* ICCF84 și ICCF284 și a tulpinii *Trichoderma*
17 *harzianum* ICCF179.

19 Cererile de brevet **RO 128931 A0** și **RO 131177 A2** descriu o tulpină de
Brevibacillus parabravis B50, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial
Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) B 001413, și, respectiv, o tulpină de
21 *Trichoderma asperellum* Td36b, depozitată la National Collection of Agricultural and
Industrial Microorganisms din Budapesta, sub numărul NCAIM (P) F 001434, utilizate în
23 compoziții destinate tratamentelor efectuate în culturile de plante, în vederea biostimulării.

Brevetul **US 8148138 B2** revendică utilizarea combinațiilor dintre tulpini de
25 *Trichoderma virens* ATCC 58678 sau G1-21 și tulpini de *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC
BAA-390 sau FZB24, pentru protecția plantelor împotriva bolilor produse de agenți
27 fitopatogeni din genurile *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* și *Penicillium*, la tomate, ardei,
iarbă pentru gazon, soia, floarea-soarelui, grâu și porumb.

29 Brevetul **EP 1168922 B1** prezintă o combinație de tulpini de bacterii cu acțiune de
favorizare a creșterii vegetale (PGPR - plant growth promoting rhizobacteria), din grupul
31 *Bacillus*, *Bacillus subtilis* GB03 și *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, împreună cu tulpini de
Trichoderma, substrat organic aminat, și un compus vegetal aromat, pentru a genera plante
33 supresive pentru boli.

35 Cererea de brevet **CN 102342300 A** descrie utilizarea unui consorțiu pe bază de
Brevibacillus brevis TW și *Trichoderma viride*, formulat ca pulbere umectabilă, pentru
protejarea culturilor de fructe și legume față de bolile fungice.

37 În ultimii ani au fost descrise și o serie de consorții de *Trichoderma* și *Bacillus* cu
acțiune de biostimulare a creșterii și dezvoltării plantelor. Biostimulanții pentru plante sunt
39 o categorie nouă de inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care modulează procesele
fiziologice „pentru a spori absorbția și eficiența utilizării nutrienților, toleranța la stresurile
41 abiotice și calitatea recoltei” (www.biostimulants.eu).

Brevetul **US 9017442 B2** protejează utilizarea combinațiilor dintre tulpinile de
43 *Trichoderma virens* ATCC 58678 sau G1-21 și tulpinile de *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC
BAA-390 sau FZB24, ca biostimulant pentru producerea de semnale care facilitează
45 germinarea și colonizarea rădăcinilor cu micoriză într-un mediu bogat în fosfor.

47 Cererea de brevet **KR 20100133307 A** dezvăluie un consorțiu care stimulează
germinarea plantelor, care, pe lângă tulpinile de *Bacillus sp.* CNB-1(KACC 91559P)
și *Trichoderma sp.* CNT-1(KACC 93107P), include și tulpina de *Streptomyces sp.*
49 CNS-1(KACC 91567P).

RO 131932 B1

Sunt cunoscute Consorții care includ și tulpini aparținând genului *Trichoderma* și grupului bacteriilor gram-pozitive endo-sporulante care au o acțiune sinergică în degradarea materialului vegetal. 1
3

Cererea de brevet **CN 104651277 A** exemplifică un biopreparat realizat din 5...15% pulbere de *Bacillus subtilis*, tulpina 07 (CGMCC No: 10248) (5...15%), 50...70% pulbere de *Trichoderma longibrachiatum*, tulpina 08 (CGMCC No: 10144) și 25...45% pulbere de *Streptomyces griseorubens*, tulpina 09 (CGMCC No: 10247). 5
7

Nu s-au descris până acum nici tulpini biostimulante pentru plante, nici Consorții de astfel de tulpini, care să elibereze controlat biosiliciu din resturile vegetale, în condiții de câmp, și, în special, din resturile vegetale care acoperă solul în cadrul sistemelor de agricultură. 9
11

În pofida abundenței sale în scoarța pământului, rezervorul de siliciu biodisponibil pentru plante în sol este limitat, reciclarea biosiliciului fiind esențială pentru asigurarea pe termen lung a fertilității solurilor (Haynes, 2014, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177: 831-844). Rolul benefic al siliciului pentru plante a fost demonstrat prin utilizarea unor mutante care au o capacitate redusă de preluare a siliciului din sol (**Ma și Yamaji, 2015. Trends in Plant Science, 20:435-442**), iar studiile recente au arătat că siliciul are toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (**Savvas și Ntatsi 2015, Scientia Horticulturae, 196:66-81**). Siliciul solubil este unul dintre puținii elicitori care amorsează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din plante (**Van Bockhaven et al. 2013. Journal of Experimental Botany, 64:1281-1293**). Acțiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în apărarea plantelor față de atacul patogenilor și al dăunătorilor, dar are efecte și de: creștere a eficienței de utilizare a nutrienților; reducere a toxicității metalelor grele; limitare a efectelor stresului hidric (salin, secetă) și a stresului termic - îngheț, temperatură excesivă (**Liang et al. 2015, Silicon in Agriculture, Springer Netherlands, Dordrecht, p. 235**). 13
15
17
19
21
23
25

Siliciul este preluat de către rădăcinile plantelor ca acid ortosilicic, H_4SiO_4 , în concentrații cuprinse între 0,2 și 0,6 mM (**Epstein 1999, Annual Review of Plant Biology, 50: 641-664**). Acidul ortosilicic este un acid foarte slab, cu patru funcțiuni acide, la care valoarea pK_a cea mai mică este de 9,8 (**Iler, The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons, New York, 1979, p. 207**). Aceasta înseamnă că la pH 9,8 acidul ortosilicic este prezent 50% în stare nedisociată și 50% în stare disociată. Între valorile de pH 2 și 8 acidul ortosilicic este o moleculă neutră, complet nedisociată. La concentrații mai mari de 2 mM începe să polimerizeze, prin reacții de policondensare, cu eliberare de apă (**McIntosh, 2012, Physical Chemistry Chemical Physics, 14: 996-1013**). 27
29
31
33
35

În plante siliciul îndeplinește două funcții majore, una structurală și cealaltă fiziologică/biochimică (de biostimulant). Funcția structurală este asociată răspunsului inteligent al apoplastului (**Nishitani și Demura 2015, Plant and Cell Physiology, 56: 177-179**) și implică, în cazul plantelor care acumulează siliciu, și formarea de fitolite cu rol analog unui endo-schelet (**Schoelynck et al. 2014, Journal of Vegetation Science, 25: 301-313**). Această funcție structurală are și un rol de apărare împotriva atacului de boli și dăunători, generând diferite bariere care limitează pătrunderea fitopatogenilor și au un efect repelent asupra dăunătorilor. Funcția fiziologică, implicată în reglarea fină/orchestrarea căilor metabolice specifice răspunsului de apărare din plante, necesită transportul acidului ortosilicic (H_4SiO_4) prin simplast/citoplasmă, și implică un sistem co-operat, prezent doar în rădăcini, format din acvaporine (proteine membranare care constituie canale pentru transportul facilitat al apei și al moleculelor mici, neutre/neionizate - nedisociate), din 37
39
41
43
45
47

RO 131932 B1

1 subfamilia NIP-26 (nodulin-26-like proteins), denumite și metaloido-porine (**Pommerrenig**
2 **et 2015. Plant science, 238:212-22**), și proteine de transport activ/„pompe” moleculare de
3 siliciu, care transferă acidul ortosilicic în xilem (**Ma și Yamaji 2015, Trends in Plant**
4 **Science, 20:435-442**).

5 Pentru o biostimulare optimă de către siliciu a plantelor de cultură este necesară deci
6 eliberarea continuă a unor mici cantități de acid ortosilicic în soluția solului, care să fie preluat
7 și translocat prin simplast de către plantele de cultură. În cadrul sistemelor de agricultură
8 conservativă această eliberare continuă de (bio)siliciu este realizabilă din resturile vegetale
9 care acoperă permanent solul în cadrul sistemelor de agricultură conservativă. Acoperirea
10 permanentă a solului este un principiu important al sistemelor de agricultură conservativă
11 (CA) (a se vedea, de exemplu, site-ul FAO CA: <http://www.fao.org/ag/ca/1a.html>). Resturile
12 vegetale care acoperă solul limitează evaporarea apei, facilitează infiltrarea apei, reduc
13 eroziune, ameliorează structura solului, cresc conținutul de materie organică și de carbon,
14 și moderează temperatura solului în zonele calde (**Fabrizzi et al. 2005, Soil & Tillage**
15 **Research, 81: 57-69**). În pofida numeroaselor avantaje, sunt și o serie de efecte negative
16 asociate cu sistemele cu resturi vegetale. Resturile de plante favorizează dezvoltarea
17 agenților fitopatogeni din sol (**Bockus și Shroyer 1998, Annual Review Phytopathology,**
18 **36: 485-500**), inclusiv a celor devastanți, cum sunt, de exemplu, cei care produc fuzarioza
19 spicului de grâu (**Leplat et al. 2013, Agronomy for Sustainable Development, 33: 97-111**).
20 Pentru că reduc temperatura solului, resturile vegetale determină și întârzieri ale primelor
21 fenofaze din ciclul de dezvoltare specific culturilor înființate în astfel de sisteme CA (**Page**
22 **et al. 2013, Australasian Plant Pathology, 42: 363-377**). Consorții de microorganisme, cu
23 activitate antagonică și de biostimulare a dezvoltării plantelor, inclusiv datorită eliberării
24 treptate și lente de biosiliciu, aplicate pe resturile vegetale care acoperă solul, ar compensa
25 aceste efecte secundare negative ale sistemelor CA.

26 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în eliberarea controlată a
27 biosiliciului din resturile vegetale care acoperă solul în cadrul sistemelor de agricultură
28 conservativă, concomitent cu stimularea creșterii plantelor și protecția acestora împotriva
29 microorganismelor patogene.

30 Soluția tehnică descrisă de prezenta invenție se referă la un consorțiu de
31 microorganisme pentru stimularea creșterii plantelor, constituit din tulpina de *Trichoderma*
32 *asperellum* Td36b, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial
33 Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) F 001434, și tulpina de *Brevibacillus*
34 *parabrevis* B50, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial
35 Microorganisms din Budapesta sub numărul NCAIM (P) B 001413. Aplicate împreună,
36 stimulează creșterea plantelor în faza de plantulă, și degradează resturile vegetale de grâu,
37 cu eliberarea de biosiliciu, determinând creșterea concentrației de siliciu biodisponibil din
38 soluția solului.

39 Consorțiul are activitatea optimă la o rată inițială de amestecare a tulpini de
40 *Trichoderma* cu cea de *Brevibacillus* de 1:5, raportat la numărul de unități formatoare de
41 colonii per mililitru de suspensie.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

43 - asigură stimularea plantelor de cultură în primele faze de vegetație, datorită
44 efectului biostimulant sinergic al tulpinilor de microorganisme;

45 - eliberează biosiliciul din resturile vegetale de grâu, care acoperă solul în cadrul
sistemelor de agricultură conservativă;

RO 131932 B1

- determină o creștere a concentrației de acid ortosilicic, specia moleculară de siliciu cu biodisponibilitate maximă, în soluția solului, ca urmare a eliberării de biosiliciu din resturile de grâu. 1
3

În continuare se prezintă exemple de realizare a invenției, care o ilustrează fără a o limita. 5

Exemplul 1

Se realizează un amestec de tulpini de *Trichoderma asperelum* Td36b, ca suspensie conidială prelevată din gazon crescut 5 zile pe mediu cartof-glucoză agar, normalizată la 10^7 ufc/ml, *Brevibacillus parabrevis* B50, suspensie de spori prelevată din mediul lichid cartof-glucoză, normalizată la 10^7 ufc/ml, în raport de 1:5. 7
9

Tulpina *Trichoderma asperelum* Td36b, depozitată sub numărul (P) F 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) Budapesta, a fost izolată din litiera solului, prelevată din zona Păulești, Prahova, România. Pentru izolare s-a utilizat mediul de cultură apă-agar, iar pentru purificare mediul cartof, glucoză, agar (CGA). 11
13

Raza coloniilor dezvoltate de tulpina *T. asperelum* Td36b, pe mediu CGA după 72 h, la 30°C, este de (7-) 54(-64) mm; la 35°C este de (0-)27(-42) mm, iar la 40°C: 0 mm. Coloniile formate pe mediu CGA la 25°C, după 40 h în întuneric, nu prezintă niciun pigment galben care să difuzeze în mediul agarizat. Coloniile cultivate pentru 72 h pe mediu CGA, la 30°C, în întuneric, formează până la 5 inele concentrice, cu o producție densă de conidii și fără miceliu aerian. Conidiile sunt spre centru de culoare verde închis, iar spre margini sunt doar în curs de formare. Conidiile formate sunt verde închis, globuloase până la subglobuloase sau ovoidale, cu dimensiuni de 4,0-5,0 (-6,0) x 2,5-3,0 μm. Conidioforii au un aspect simetric ce se termină în două sau mai multe fialide, cu ramificări primare apărute lângă apex, frecvent împerecheate și proiectate la aproape 90° față de axa principală. Clamidosporii se formează abundent după incubare o săptămână la 20°C în întuneric, terminal și uneori intercalați, pe hifele imersate, fiind subglobuloși până la ovoidali, netezi, verzi pal. Fialidele sunt tipic produse în vârfurile ramificațiilor primare, secundare și terțiare, rareori direct pe lungimea ramificațiilor, tipic în verticiliu de 2 până la 4 fialide. 15
17
19
21
23
25
27

Caracteristicile fiziologice, de utilizare a diferitelor substraturi sunt descrise în cele ce urmează. Monozaharidele determină o creștere mai bună decât dizaharidele, urmate de polizaharide. Glicerina este puțin favorabilă pentru creșterea tulpinii Td36b. Dintre monozaharide, riboza și fructoza s-au dovedit cele mai bune surse de carbon, observându-se o dezvoltare optimă a tulpinii pe mediile care conțin aceste surse de carbon. Urmează glucoza, manita, D-manoza, D-galactoza și arabinoza, care permit o dezvoltare moderată. Dintre dizaharide, cele mai bune rezultate a dat maltoza, urmată de lactoză (dezvoltare moderată) și zaharoză (dezvoltare mai slabă). Dintre polizaharide, cele mai bune rezultate a dat celuloza, cu dezvoltare optimă, urmată de amidon, pe mediile respective înregistrându-se dezvoltare moderată. Sporularea a fost foarte bună în majoritatea variantelor (+++), bună în cazul zaharozei (++) și mai slabă în cazul glicerinei (+). 29
31
33
35
37
39

Peptona, aminoacizii L-asparagină, L-valină, L-serină, L-cisteină și L-izoleucină, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ și NaNO_2 s-au dovedit cele mai bune surse de azot, determinând o dezvoltare optimă. Urmează în ordine descrescândă azotații (NH_4NO_3 , NaNO_3), vitamina B12 și aminoacizii L-alanină, L-lizină, L-arginină, L-triptofan, care au determinat o dezvoltare moderată. Rezultate mai slabe au avut ureea, NH_4Cl , KNO_3 , KNO_2 . Sporularea a fost foarte bună (+++) în majoritatea variantelor, exceptând L-lizina, L- triptofanul, L-alanina, L-arginina și azotații, la care sporularea a fost doar bună (++) 41
43
45

RO 131932 B1

1 Temperaturile de creștere sunt: temperatura optimă: 22...25°C; temperatura minimă:
2 2°C; temperatură maximă: 37°C. Temperaturile între 10 și 18°C determină o creștere slabă
3 a tulpinii *Trichoderma asperellum* Td36b, fără sporulare la 48 h, și cu sporulare slabă la
4 144 h (+). Reacția substratului de cultură: pH optim: 4,0...5,5; dezvoltare slabă a ciupercii la
5 valori de pH de la 9,0 la 13,0.

6 Identificarea realizată pe criterii morfologice a fost confirmată de analiza moleculară
7 a ITS1 (internal transcribed spacers 1) a clusterului pentru gena rRNA (marker universal
8 fungal BarCode, <http://www.isth.info>). S-au folosit primerii specifici ITS1 SR6R f și LR1 r
9 (conform protocol BarCode <http://www.isth.info/methods>). Compararea secvențelor s-a
10 realizat cu programul TrichoBlast (<http://www.isth.info/tools/blast/index.php>).

11 Tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b este antagonistă față de *Fusarium*
12 *graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium*
13 *daliae*, *Botrytis allii*, inclusiv datorită producerii unor metaboliți volatili cu activitate antifungi
14 fitopatogeni (Răut et al. 2014, *Revista de Chimie* 65: 1285-1288).

15 Tulpina B50 de *Brevibacillus parabrevis* a fost obținută la Institutul Național de
16 Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie ICECHIM, București, dintr-o probă de sol
17 provenită din Muntenia de sud. Pentru izolarea bacteriei s-a utilizat agar nutritiv (peptonă -
18 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
19 s-a utilizat mediul Luria-Bertani agarizat (LBA: bacto-tryptonă - 10 g/l, extract de drojdie - 5 g/l,
20 NaCl - 10 g/l, agar - 20 g/l, la 1000 ml apă; pH = 7,5), la o temperatură optimă de incubare
21 de 28°C.

22 Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 125 izolate de bacili
23 sporulanți gram-pozitivi, pe baza unor teste de laborator prin care s-au determinat: acțiunea
24 antagonistă *in vitro* față de ciupercile fitopatogene de sol (*Fusarium graminearum*, *Alternaria*
25 *spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*,
26 *Sclerotium bataticola*, *Botrytis cinerea*); formarea de biofilme *in vitro*; biosinteza de compuși
27 care stimulează plantele (poliamine); inocuitatea în testul pe *Galleria mellonella*.

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

33 Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin aplicarea unui protocol de
34 lucru caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure - colonii izolate, tehnica
35 însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului bacterian; electroforeză în gel pentru
36 detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 16S rADN prin tehnica PCR și electroforeză în
37 gel; purificarea ADN-ului ribozomal; amplificare enzimatică a acizilor nucleici înainte de
38 secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-ului codificând pentru 16sRNA. Secvențierea
39 nucleotidică a fost realizată cu metoda Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer,
40 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele
41 au fost analizate folosind programul CHROMAS 2.33 (Technelysium Pty Ltd).

42 Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de
43 gene NCBI (National Center for Biotechnology Information) s-a realizat cu ajutorul
44 programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Rezultatele au dovedit o
45 similaritate de 99% cu tulpina IFO 12334 de *Brevibacillus parabrevis*.

46 Profilul acizilor grași membranari a fost determinat cu ajutorul unui sistem Sherlock®
47 Microbial ID, prin folosirea procedurii Instant FAME™. Esterii acizilor grași din membrana
48 bacteriană au fost separați pe un cromatograf de gaze GC 6890N (Agilent Technologies)

RO 131932 B1

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).

Tabelul 1

Profilul acizilor grași din membrana tulpinii B50

Timp retenție	Tip acid gras membranar	Proporție (%)
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 alcool	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 20H	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 maximum 2 cm de o rondea calibrată (5 mm) de miceliu. Culturile de ciuperci fitopatogene au fost împropățate pe mediu CGA (cartof, glucoză, agar) și incubate la 28°C, timp de 5 zile. Tulpina B50 a fost împropățată pe mediu Luria-Bertani (LB) agarizat, prin incubare la 28°C, timp de 24 h. Testarea activității antagoniste *in vitro* a fost efectuată pe mediul cu cartof-glucoză-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 h. Experimentele de testare a antagonismului *in vitro* au fost repetate de trei ori.

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 fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina B50
<i>Fusarium graminearum</i> DSM4527	5
<i>Fusarium oxysporum f. sp. 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 spp.</i>	5

Rezultatele (tabelul 2) 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).

A fost determinată formarea de poliamine de către bacteriile *B. parabrevis* B50. Poliaminele exogene au o acțiune de biostimulare a plantelor, contribuind inclusiv la ameliorarea răspunsului la stresurile biotice și abiotice (Liu et al., 2015, *Frontiers in plant science*, 6:827). 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 (Cassá et al., 2009, *European Journal of Soil Biology*, 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, *Infection and Immunity*, 76:1267-1275. 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.

A fost realizat un experiment prin care s-a urmărit biotestarea efectului stimulator a 4 tulpini de microorganisme, incluzându-le separat pe cele două din consorțiu, și a consorțiului *T. asperelum* Td36b și *B. parabrevis* B50 asupra creșterii plantulelor test de tomate. Fiecare tulpină a reprezentat o variantă experimentală. S-a realizat pentru comparare și o variantă martor. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în 4 repetiții, fiecare repetiție având 5 plante.

Semințele de tomate au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfecție a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 s, cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă. Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4%, timp de 15 min. Ulterior au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 în 25 de min, timp de 2 h. Semințele au fost inoculate prin imersie în 3 ml

RO 131932 B1

suspensie de propagule fungice, în concentrație de 10^6 ufc/ml în tampon fosfat cu 2% carboxi-metil-celuloză, și apoi au fost depuse în pungă sterile de creștere Cyg (Mega International, Newport, MN, SUA). Pe toată durata experimentului pungile au fost umectate zilnic cu o soluție nutritivă Hoagland 0,25%. Creșterea rădăcinuțelor plantulelor de tomate a fost analizată la 3 săptămâni. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3, ca medie a trei determinări, analizate privind relevanța statistică prin ANOVA.

Tabelul 3

Lungimea totală (mm) a rădăcinuțelor plantulelor de tomate
la 3 săptămâni de la semănat

Varianta	Lungimea totală a rădăcinii (mm)	
Martor neinoculat	184,2	c
<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	219,5	b
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZ824	217,3	b
<i>B. parabrevis</i> B50	212,6	b
<i>T. asperellum</i> Td36b	224,4	b
<i>T. asperellum</i> Td36b + <i>B. parabrevis</i> B50	252,2	a

Rezultatele au evidențiat că atât tulpina Td36b, cât și tulpina B50 determină creșteri distinct semnificative ale rădăcinuțelor plantulelor test de tomate, comparativ cu martorul neinoculat. Consorțiul format din cele două tulpini are un efect de stimulare și mai pronunțat, cele două tulpini interacționând sinergic în stimularea creșterii plantulelor de tomate.

Experimentul a fost repetat pentru plantule de monocotiledonate (grâu, orz) și de dicotiledonate (castraveți, varză), cu rezultate similare, cele două tulpini interacționând sinergic. Biostimularea dezvoltării plantelor se datorează capacității celor două tulpini de a produce compuși care stimulează creșterea și dezvoltarea plantelor, deja prezentată pentru fiecare dintre cele două tulpini (*Trichoderma asperellum* Td36b - Raut et al. 2015, Journal of Biotechnology, 208, S62; *Brevibacillus parabrevis* B50 - cerere de brevet **RO 128931 A0**), dar nerevendicată ca o caracteristică sinergică a consorțiului format de cele două tulpini.

Exemplul 2

A fost testată capacitatea celor două tulpini, singure sau separate, de a degrada paie de grâu și de a elibera biosiliciu din acestea.

Pentru evidențierea capacității de degradare a materialului vegetal s-a realizat un experiment prin care s-a urmărit consumul de oxigen și eliberarea diferiților compuși din material vegetal tratat cu tulpini de microorganisme. Materialul vegetal (paie de grâu) a fost măcinat și trecut pe sita de 0,250 mm. S-au ambalat câte 10 g de pulbere care s-au sterilizat prin iradiere gamma (la IRASM, IFIN-HH, București). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g de pulbere de material vegetal, care s-au adus aseptice într-un Erlenmayer de 50 ml din material plastic, steril (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Peste pulberea fin măcinată s-au adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. S-a omogenizat prin agitare și s-a inoculat apoi cu 1 ml suspensie microbiană, normalizată la 10^8 ufc/ml (pentru tulpinile luate separat) și 5×10^7 ufc/ml B50 + 10^7 ufc/ml Td36b. S-a menținut la agitator timp de 24 h, la temperatura de 28°C, după care s-a trecut aseptice într-un vas de respirație Strathox (Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie). S-au efectuat determinările de respirație/producere de bioxid de carbon timp de 12 h. După efectuarea determinărilor de respirație s-au separat prin filtrare supernatantele, în care s-au determinat

RO 131932 B1

1 siliciu total și siliciu solubil - acid ortosilicic. Siliciul total s-a determinat prin ICP-OES
(Georgiadis et al. 2013, Geoderma, 209: 251-261), pe un spectrometru cu plasma cuplată
3 inductiv, de tip Optima 2100 DV ICP-OES (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Conținutul de acid
ortosilicic liber a fost determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-
5 Millipore). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.

7 *Tabelul 4*

9 *Activitatea de degradare a materialului vegetal
de către tulpinile de microorganisme testate**

11 Tulpina	Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară)	Siliciu total (μM)	Siliciu solubil (μM)
13 Martor	0,12 ± 0,03c	0,17 ± 0,06c	0,02 ± 0,01c
B50, 10 ⁸ ufc/ml	1,06 ± 0,32b	0,34 ± 0,08b	0,17 ± 0,04b
15 Td36b, 10 ⁸ uf c/ml	1,12 ± 0,05b	0,24 ± 0,07b	0,14 ± 0,05b
B50, 5 x 10 ⁷ ufc/ml + Td36b, 107 uf c/ml	2,15 ± 0,04a	0,57 ± 0,12a	0,34 ± 0,07a

17 *valorile urinate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P > 0,05.

19 Rezultatele din tabelul 4 demonstrează un efect sinergic al celor două tulpini, în ceea
ce privește degradarea materialului vegetal (paie de grâu) și eliberarea de siliciu total și de
21 siliciu solubil (acid ortosilicic) din paiele de grâu.

Exemplul 3

23 A fost testată capacitatea consorțiului format din cele două tulpini, dar și separat
pentru fiecare dintre ele, de a elibera acid silicic, H₄SiO₄, în soluția solului, utilizând trei tipuri
25 de sol: preluvosol roșcat molie, București Sud; cernoziom cambie, Fundulea-Călărași;
regosol calcaric, Păulești-Prahova.

27 Probele de sol prelevate din zonele menționate au fost uscate, apoi sitate prin sită
de 1 mm. Amestecul de sol cu a fost distribuit în coloane lizimetre de PVC, de 30 cm lungime
29 și 7,5 cm diametru, prevăzute cu capace. Amestecul a fost menținut în respectivele coloane
lizimetre cu granule poroase de polistiren expandat (2...4 mm, Adeplast, Ploiești, România)
31 plasate la baza coloanelor.

33 S-au distribuit câte 1,350 kg în fiecare coloană lizimetru, care s-au umectat la 40%
umiditate cu 750 ml apă ultrapură Milli-Q®. La suprafața solului s-au distribuit câte 12 g de
paie de grâu uscate, echivalentul unui strat de circa 2,5 cm. Paiele au fost tratate cu câte 15
35 ml suspensie microbiană, normalizată la 10⁸ ufc/ml (pentru tulpinile luate separat) și 5 x 10⁷
ufc/ml B50 + 10⁷ ufc/ml Td36b.

37 Caracteristicile solurilor utilizate, pentru orizontul 0...15 cm, orizont în care este mai
pregnantă în practică influența tratamentelor asupra resturilor vegetale, și în care eventual
39 sunt înglobate microorganismele după aplicarea tratamentelor pe resturile vegetale, sunt
prezentate în tabelul 5. Caracteristicile considerate sunt cele care influențează dezvoltarea
41 microorganismelor și includ date referitoare la conținutul de materie organică (humus),
textură, pH, capacitatea de câmp (pentru reținerea apei), capacitatea de reținere a apei,
43 densitatea aparentă etc.

Caracteristicile solurilor testate, pentru orizontul 0...15 cm

Caracteristică	UM	Preluvusol roșcat molie București	Cernoziom cambie Fundulea	Regosol calcaric Păulești
Humus (Cx 1,72)	%	2,77	3,3	1,4
Textură	-	Luto-argilos	Argilo-lutos	Luto-nisipos
pH	Unități pH	6,5	6,3	7,3
Total N	%	0,219	0,179	0,089
Capacitatea de câmp	%	26,7	11,4	11,8
CaCO ₃	%	1,2	0,0	2,9
Capacitatea totală de schimb cationi, CEC	meq/100 g	21,75	21,1	21,3
Fosfor total (AL)	ppm	54	28	77
Potasiu mobil	ppm	87	98	140
Densitate aparentă	g/cm ³	1,12	1,15	1,20

Coloanele au fost incubate la temperatura camerei (aproximativ 21 °C) timp de 56 de zile, prelevându-se levigate la 7, 14, 28, 42 și 56 de zile. Pentru obținerea levigatelor s-a folosit un volum de 500 ml apă ultrapură. Levigarea coloanelor lizimetru s-a realizat gravitațional, iar excesul de soluție a fost îndepărtat prin vacuum limitat (-0,5 bari), timp de 2 min. Vacuumarea aceasta limitată este suficientă pentru a permite aerare prin capacele neetanșe ale coloanelor lizimetru, și menținerea coloanei de sol în condiții aerobe.

Levigatele s-au prelevat în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Probe de câte 1 ml de levigat au fost diluate cu 4 ml apă ultrapură în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber a fost determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Acest test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația absolută de acid silicic a fost calculată după construcția unei curbe de calibrare folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore).

S-a lucrat comparativ cu coloane lizimetru martor, care au fost umplute numai cu diferitele soluri testate, plus paie de grâu, tratate numai cu apă pură, fără adaos de tulpini microbiene. În levigate s-a determinat și siliciu total, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, Geoderma, 209: 251-261). Toate probele s-au realizat în trei repetiții. Rezultatele prezentate în tabelul 6 demonstrează efectul de sinergie asupra biodisponibilizării siliciului, al tulpinilor *Trichoderma asperellum* Td36b și *Brevibacillus parabrevis* B50, reunite în consorțiu.

RO 131932 B1

Tabelul 6

Eliberarea siliciului din ceramicele poroase în solurile testate, în coloanele lizimetru, în condițiile experimentale descrise mai sus

Varianta experimentală	Siliciu în levigate (mM)									
	7		14		28		42		56 zile	
	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}
Preluvusol roșcat + Td36b	0,21±0,02	0,23±0,03	0,24±0,03	0,27±0,02	0,24±0,04	0,28±0,03	0,26±0,03	0,30±0,03	0,27±0,04	0,32±0,05
Preluvusol roșcat + B50	0,22±0,02	0,23±0,04	0,24±0,04	0,26±0,03	0,26±0,05	0,33±0,03	0,27±0,02	0,33±0,04	0,29±0,04	0,35±0,06
Preluvusol roșcat + Td36b+B50	0,25±0,04	0,27±0,02	0,29±0,02	0,31±0,03	0,33±0,03	0,35±0,04	0,36±0,02	0,38±0,03	0,40±0,03	0,43±0,04
Preluvusol roșcat (martor netratat cu <i>Trichoderma</i>)	0,16±0,02	0,20±0,02	0,17±0,04	0,24±0,02	0,18±0,02	0,25±0,04	0,18±0,03	0,24±0,02	0,17±0,03	0,24±0,03
Cernoziom cambie + T36b	0,22±0,05	0,32±0,04	0,24±0,03	0,33±0,03	0,25±0,05	0,34±0,04	0,28±0,05	0,36±0,04	0,30±0,03	0,38±0,05
Cernoziom cambie Fundulea +B50	0,23±0,04	0,33±0,03	0,24±0,02	0,35±0,04	0,26±0,03	0,35±0,04	0,30±0,04	0,39±0,05	0,35±0,03	0,40±0,05
Cernoziom cambie Fundulea + Td36b+B50	0,24±0,03	0,35±0,04	0,28±0,03	0,39±0,04	0,34±0,04	0,47±0,02	0,38±0,05	0,51±0,06	0,42±0,02	0,54±0,03
Cernoziom cambie Fundulea (martor netratat cu <i>Trichoderma</i>)	0,20±0,03	0,30±0,02	0,22±0,04	0,32±0,04	0,21±0,05	0,35±0,05	0,23±0,03	0,33±0,02	0,24±0,03	0,35±0,02
Regosol calcaric Păulești + Td36b	0,23±0,03	0,30±0,04	0,24±0,03	0,41±0,03	0,25±0,05	0,33±0,04	0,27±0,05	0,37±0,03	0,29±0,03	0,35±0,03
Regosol calcaric Păulești + B50	0,23±0,04	0,30±0,02	0,25±0,02	0,43±0,04	0,25±0,03	0,45±0,04	0,27±0,04	0,49±0,05	0,28±0,03	0,40±0,05
Regosol calcaric Păulești + Td36b+B50	0,24±0,03	0,31±0,02	0,29±0,03	0,44±0,04	0,36±0,04	0,47±0,02	0,38±0,05	0,53±0,06	0,39±0,02	0,51±0,03
Regosol calcaric Păulești (martor netratat cu <i>Trichoderma</i>)	0,21±0,03	0,30±0,02	0,22±0,04	0,32±0,04	0,21±0,05	0,35±0,05	0,21±0,03	0,33±0,02	0,22±0,03	0,35±0,02

RO 131932 B1

Pentru niciunul dintre solurile testate nivelul de acid ortosilicic eliberat nu a depășit valoarea de 0,6 mM, uzual preluată de rădăcinile plantelor. Tulpinile Td36b și B50 reunite în consorțiu determină o creștere a concentrației de acid ortosilicic, specia moleculară de siliciu cu biodisponibilitate maximă, în soluția solului, ca urmare a eliberării de biosiliciu din resturile de grâu. 1
3
5

Siliciul biodisponibil crescut în soluția solului acționează ca un biostimulant pentru plante, fiind recunoscut rolul acestui element benefic ca biostimulant pentru plante (**Savvas și Ntatsi 2015, Scientia horticulturae, 196: 66-81**). Consorțiul de *Trichoderma asperellum* Td36b și *Brevibacillus parabrevis* B50 își exercită astfel acțiunea biostimulantă și mediată, prin intermediul creșterii biodisponibilității siliciului. Siliciul biodisponibil eliberat din coloana de sol este și rezultat al procesului de disociere a acidului silicic absorbit pe coloizii solului, obținut printr-un efect de feedback pozitiv al acidului ortosilicic eliberat, din resturile vegetale, sub acțiunea microroganismelor/consorțiului de microorganisme în soluția solului (Ronchi et al. 2015, Catena, 133: 85-96). 7
9
11
13

Această lucrare a fost realizată prin programul Parteneriate în domenii prioritare - PN II, derulat cu sprijinul MEN - UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0846, contract 159/2014 CERES. 15
17

RO 131932 B1

1

Revendicare

3

Consoțiu de microorganisme pentru stimularea creșterii plantelor, **caracterizat prin aceea că** este constituit din tulpina de *Trichoderma asperellum* Td36b, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, sub numărul NCAIM (P) F 001434, și tulpina de *Brevibacillus parabrevis* B50, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, sub numărul NCAIM (P) B 001413, având activitate optimă la o rată de utilizare a celor două tulpini de 1:5, raportată la numărul de ufc/ml suspensie.

5

7

9



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 507/2019