



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00943

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

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

(71) Solicitant:
• 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;
• ARSENE 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

(54) CONSORȚIU PE BAZĂ DE TRICHODERMA ȘI BACTERII
GRAM-POZITIVE SPORULANTE CU ACTIVITATE DE
BIOSTIMULARE A PLANTELOR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un consorțiu de microorganisme benefice plantelor de cultură. Consorțiul conform invenției este constituit din tulpini de *Trichoderma asperelum* Td36b, NCAIM(P)F001434 și tulpina de *Brevibacillus parabrevis* B50, (P) B001413, care, prin aplicare, stimu-

lează creșterea plantelor în faza de plantulă și degradează resturile vegetale de grâu, cu eliberarea de biosilicii.

Revendicări: 2

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 PE BAZĂ DE TRICHODERMA SI BACTERII GRAM-POZITIVE SPORULANTE CU ACTIVITATE DE BIOSTIMULARE A PLANTELOR

Prezenta invenție se referă la un consorțiu de microorganisme benefice plantelor de cultură, constituit din microorganisme aparținând genului *Trichoderma* și grupului bacteriilor gram-pozitive endo-sporulante, care au acțiune sinergică de biostimulant pentru plante, inclusiv datorită eliberării controlate a biosiliciului din resturile vegetale, destinat utilizării în tehnologiile de cultivare a plantelor, în special pentru tratamente aplicate în sistemele de agricultură conservative.

Sunt cunoscute diferite consorții de microorganisme benefice plantelor de cultură, iar printre cele mai des revendicate sunt cele care sunt constituite din tulpini aparținând genului *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, amândouă grupurile de microorganisme fiind recunoscute pentru tulpinile care au activitate antagonistă. Brevetul SUA 8148138 B2 revendică utilizarea combinațiilor dintre tulpinilor de *Trichoderma virens* ATCC 58678 sau G1-21 și tulpinile de *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC BAA-390 sau FZB24 pentru protecția plantelor împotriva bolilor produse de agenți fitopatogeni din genurile *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* și *Penicillium*, la tomato, ardei, iarbă pentru gazon, soia, floarea-soarelui, grâu și porumb. Brevetul EP1168922 B1 prezintă o combinație de tulpinii de bacterii cu acțiune de favorizare a creșterii vegetale (PGPR - *plant growth promoting rhizobacteria*) din grupul *Bacillus*, *Bacillus subtilis* GB03 și *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, împreună cu tulpini de *Trichoderma*, substrat organic aminat și un compus vegetal aromă, pentru a genera plante supresive pentru boli. Cererea de brevet CN102342300 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.

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 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 abiotice și calitatea recoltei” (www.biostimulants.eu). Brevetul RO122676 B1 se referă la un procedeu de obținere a unor bioproduse cu rol de fertilizare, biostimulare și antagonism microbial, care

include tulpinile bacteriene *Bacillus subtilis* ICCF84 și ICCF284 și *Trichoderma harzianum* ICCF179. Brevetul SUA 9017442 B2 protejează utilizarea combinațiilor dintre tulpinilor de *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 germinarea și colonizarea rădăcinilor cu micoriză într-un mediu bogat în fosfor. Cererea de brevet KR20100133307 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. CNS-1(KACC 91567P).

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. Cererea de brevet CN104651277 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).

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.

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, 235 pg.).

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 pKa cea mai mică este de 9,8 (Iler, *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, New York, 1979, pg. 207). Aceasta înseamnă că la pH 9,8 acidul ortosilicic este prezent 50% în stare nedisociată și 50% în stare disociată. Intre 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).

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

Pentru o biostimulare optimă de către siliciu a plantelor de cultură este necesară deci eliberarea continuă a unor mici cantități de acid ortosilicic în soluția solului, care să fie preluat și translocat prin simplast de către plantele de cultură. În cadrul sistemelor de agricultură conservativă această eliberare continuă de (bio)siliciu este realizabilă din resturile vegetale care acoperă permanent solul în

47
78

cadrul sistemelor de agricultură conservativă. Acoperirea permanentă a solului este un principiu important al sistemelor de agricultură conservativă (CA) (a se vedea de ex. site-ul FAO CA: <http://www.fao.org/ag/ca/1a.html>). Resturile vegetale care acoperă solul limitează evaporarea apei, facilitează infiltrarea apei, reduc eroziune, ameliorează structura solului, cresc conținutul de materie organică și de carbon, și moderează temperatura solului în zonele calde (Fabrizzi *et al.* 2005, *Soil & Tillage Research*, 81: 57-69). În pofida numeroaselor avantaje, sunt și o serie de efecte negative asociate cu sistemele cu resturi vegetale. Resturile de plante favorizează dezvoltarea agenților fitopatogeni din sol (Bockus și Shroyer 1998, *Annual Review Phytopathology*, 36: 485-500), inclusiv a celor devastanți, cum sunt de exemplu cei care produc fuzarioza spicului de grâu (Leplat *et al.* 2013, *Agronomy for Sustainable Development*, 33: 97-111). Pentru că reduc temperatura solului, resturile vegetale determină și întârzieri ale primelor fenofaze din ciclul de dezvoltare specific culturilor înființate în astfel de sisteme CA (Page *et al.* 2013, *Australasian Plant Pathology*, 42: 363-377). Consorții de microorganisme, cu activitate antagonică și de biostimulare a dezvoltării plantelor, inclusiv datorită eliberării treptate și lente de biosiliciu, aplicate pe resturile vegetale care acoperă solul, ar compensa aceste efecte secundare negative ale sistemelor CA.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un consorțiu de microorganisme antagoniste aparținând genului *Trichoderma* și grupului bacteriilor gram-pozitive endo-sporulante, care are efecte sinergice de biostimulant pentru plante, inclusiv mediată de eliberarea controlată de biosiliciu din resturile vegetale.

Consorțiul de *Trichoderma* și bacterii gram-pozitive endo-sporulante conform invenției este constituit din tulpinile de *Trichoderma asperelum* Td36b, depozitată sub numărul NCAIM (P) F 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, Ungaria, și tulpina de *Brevibacillus parabrevis* B50, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) B 001413 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, Ungaria, care, aplicate împreună, stimulează creșterea plantelor în faza de plantulă și degradează resturile vegetale de grâu, cu eliberarea de biosiliciu, determinând creșterea concentrației de siliciu biodisponibil din soluția solului.

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

46
47

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Asigură stimularea plantelor de cultură în primele faze de vegetație, datorită efectului biostimulant sinergic al tulpinilor de microorganisme;
- ✓ Eliberează biosiliciul din resturile vegetale de grâu, care acoperă solul în cadrul sistemelor de agricultură conservativă;
- ✓ 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.

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

Exemplu 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.

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, Romania. Pentru izolare s-a utilizat mediul de cultura apa-agar, iar pentru purificare mediul cartof, glucoza, agar (CGA).

Raza coloniilor dezvoltate de tulpina *T. asperelum* Td36b, pe mediu CGA după 72 ore, 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 ore în întuneric, nu prezintă nici un pigment galben care să difuzeze în mediul agarizat. Coloniile cultivate pentru 72 ore 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 înspre centru de culoare verde închisă, iar înspre margini sunt doar în curs de formare. Conidiile formate sunt verde închis, globuloase până la sub-globuloase sau ovoidale, cu dimensiuni de 4,0–5,0 (–6,0) × 2,5 – 3,0 μm. Conidioforii au un aspect simetric care se termină în două sau mai multe fialide, cu ramificări primare apărute lângă apex, frecvent împerechate și proiectate la aproape 90 de grade față de axa principală. Clamidosporii se formează abundant 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.

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 zaharoza (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 (+).

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 descrescând 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 (++) .

Temperaturile de creștere sunt: *temperatura optimă*: 22-25°C; *temperatura minimă*: 2°C; *temperatură maximă*: 37°C. Temperaturile între 10 și 18°C determină o creștere slabă a tulpinii *Trichoderma asperellum* Td36b, fără sporulare la 48 ore și cu sporulare slabă la 144 ore (+). Reacția substratului de cultură: *pH optim*: 4.0-5.5; dezvoltare slabă a ciupercii la valori de pH de la 9,0 la 13,0.

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

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

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

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

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

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

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

Profilul acizilor grași membranari a fost determinat cu ajutorul unui sistem Sherlock® Microbial ID, prin folosirea procedurii Instant FAME™. Esterii acizilor grași din membrana bacteriană au fost separați pe un cromatograf de gaze GC 6890N (Agilent Technologies) echipat cu injector split/splitless clasic, coloana capilară tip Ultra 2 (cod Agilent 19091B-102, având lungimea de 25 m, diametrul interior de 0,2 mm, faza staționară 5% fenil metil siloxan, grosimea fazei staționare de 0,33 μm) și detector de ionizare în flacără (FID). Softurile utilizate pentru achiziția și prelucrarea automată a datelor cromatografice au fost: GC ChemStation, versiunea B.01.03 [204] / 2005, și Sherlock Microbial Identification System, versiunea 6.1 / 2008. S-au folosit metode cromatografice dezvoltate și validate de producător (MIDI, Inc.), utilizând bibliotecile de profile de esteri metilici ai acizilor grași pentru microorganisme aerobe din mediu (RTSBA6, versiunea 6.0 / 2008).

Tab. 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 alcohol	0,41
2,7959	16:0 iso	2,29
2,8441	16:1 w11c	1,02
2,9135	16:0	2,02
2,9972	15:0 2OH	0,71
3,0475	17:1 iso w10c	0,58
3,1184	17:0 iso	1,57
3,1493	17:0 anteiso	2,93
3,4887	18:1 w9c	0,35

Activitatea antagonistă a tulpinii B50 față de diferite ciuperci fitopatogene a fost determinată *in vitro* prin utilizarea tehnicii culturilor duble, prin înțeparea mediului cu biomasă bacteriană la maxim 2 cm de o rondea calibrată (5 mm) de miceliu. Culturile de ciuperci fitopatogene au fost înprospătate pe mediu CGA (cartof, glucoză, agar) și incubate la 28°C timp de 5 zile. Tulpina B50 a fost înprospătată pe mediu Luria-Bertani (LB) agarizat, prin incubare la 28°C timp de 24 ore. Testarea activității antagoniste *in vitro* a fost efectuată pe mediul cu cartof-glucoza-agar

(CGA). Plăcile Petri însămânțate cu microorganismele de testat au fost incubate la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) produsă de *B. parabrevis* B50, la 24, 48 și 72 ore. Experimentele de testare a antagonismului *in vitro* au fost repetate de trei ori.

Tab. 2. Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Brevibacillus parabrevis* B50 asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm).

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

Rezultatele (tab. 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 bacteriilor *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±0,63 nmol/ml cadaverină în mediu de cultură, și 5,12±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 (Cassán 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. asperellum* Td36b și *B. parabrevis* B50 asupra creșterii unor 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 de secunde cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă. Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4%, timp de 15 minute. Ulterior au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 în 25 de minute, timp de două ore. Semințele au fost inoculate prin imersie în 3 ml 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 pungi 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 1, ca medie a trei determinări, analizate privind relevanța statistică prin ANOVA.

Tab. 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 matorul 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 RO128931 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 Erlenmeyer 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 ore, 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 ore. După efectuarea determinărilor de respirație s-au separat prin filtrare supernatantele, în care s-a determinat siliciu total și siliciu solubil – acid ortosilicic. Siliciu total s-a determinat prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, Geoderma, 209: 251-261), pe un spectrometru cu plasma cuplată 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-Millipore). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.

Tab. 4. Activitatea de degradare a materialului vegetal de către tulpinile de microorganisme testate*.

Tulpina	Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară)	Siliciu total (μM)	Siliciu solubil (μM)
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
Td36b, 10 ⁸ ufc/ml	1,12±0,05b	0,24±0,07b	0,14±0,05b
B50, 5x10 ⁷ ufc/ml + Td36b, 10 ⁷ ufc/ml	2,15±0,04a	0,57±0,12a	0,34±0,07a

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

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 siliciu solubil (acid ortosilicic) din paiele de grâu.

Exemplu 3. A fost testată capacitatea consorțiului format din cele două tulpini, ca și separat pentru fiecare dintre ele, de a elibera acid silicic, H₄SiO₄, în soluția solului utilizând trei tipuri de sol: preluvosoș roșcat molic, București Sud; cernoziom cambic, Fundulea-Călărași; regosol calcaric, Păulești-Prahova.

Probele de sol prelevate din zonele menționate au fost uscate, sitate prin sită de 1 mm. Amestecul de sol cu a fost distribuit în coloane lizimetre de PVC, de 30 cm lungime 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) plasate la baza coloanelor.

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 grame de paie de grâu uscate, echivalentul unui strat de circa 2,5 cm. Paiele au fost tratate cu câte 15 ml suspensie microbiană, normalizată la 10⁸ ufc/ml (pentru tulpinile luate separat) și 5x10⁷ ufc/ml B50 + 10⁷ ufc/ml Td36b.

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

Tab. 5. Caracteristicile solurilor testate, pentru orizontul 0-15 cm.

Caracteristică	UM	Preluvusol roșcat molic București	Cernoziom cambic Fundulea	Regosol calcaric Păulești
Humus (C x 1,72)	%	2,77	3,3	1,4
Textură	-	Luto-argilos	Agirlo-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/100g	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 zile, prelevându-se levigate la 7, 14, 28, 42 și 56 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 ne-etanșe ale coloanelor lizimetru și menținerea coloanei de sol în condiții aerobe.

Levigatele s-a prelevat în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). S-au prelevat probe de câte 1 ml de levigat, care a fost diluat 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 absolute de acid silicic a fost calculate după construcția unei curbe de calibrare folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore).

S-a lucrat comparative 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 sinergic asupra biodisponibilizării siliciului, al tulpinilor Td36b și B50, reunite în consorțiu.

Tab. 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}
Preluvusul 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
Preluvusul 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
Preluvusul 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
Preluvusul 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 cambic + 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 cambic 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 cambic 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 cambic 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

Pentru nici unul din solurile testate nivelul de acid ortosilicic eliberat nu a depășit valoarea de 0,6 mM, uzual preluată de rădăcinile plantelor. Tulpinile reunite, 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.

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* Td36b și *Brevibacillus* B50 își exercită astfel acțiunea biostimulantă și

mediat, prin intermediul creșterii biodisponibilității siliciului. Siliciul biodisponibil eliberat din coloana de sol este rezultatul și al procesului de disociere a acidului silicic absorbit pe coloizii solului, rezultat printr-un efect de feed back pozitiv al acidului ortosilicic eliberat, din resturile vegetale, sub acțiunea microroganismelor / consorțiului microorganismelor în soluția solului (Ronchi et al. 2015, *Catena*, 133: 85-96).

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

REVENDICARI

1. Consorțiul de *Trichoderma* și bacterii gram-pozitive endo-sporulante, cu activitate biostimulantă pentru plante, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este constituit din tulpinile de *Trichoderma asperelum* Td36b, depozitată sub numărul NCAIM (P) F 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, Ungaria, și tulpina de *Brevibacillus parabrevis* B50, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) B 001413 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, Ungaria, care, aplicate împreună, stimulează creșterea plantelor în faza de plantulă și degradează resturile vegetale de grâu, cu eliberarea de biosiliciu, determinând creșterea concentrației de siliciu biodisponibil din soluția solului.
2. Consorțiul de *Trichoderma* și bacterii gram-pozitive endo-sporulante, cu activitate biostimulantă pentru plante, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** are activitatea optimă la o rată inițială de amestecare a tulpini de *Trichoderma* cu cea de *Brevibacillus* de 1:5, raportat la numărul de unități formatoare de colonii per mililitru de suspensie.