



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00364**

(22) Data de depozit: **10/07/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2025 BOPI nr. 1/2025

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI - USAMVB, BD.MĂRĂȘTI,
NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **BOIU-SICUIA OANA ALINA,
STR.CHILIA VECHE, NR.6, BL.A8, SC.1,
ET.1, AP.5, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **DIGUȚĂ FILOFTEIA CAMELIA,
ALEEA LACUL MORII, NR.127-129, SC.B,
ET.1, AP.19, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **TOMA RADU CRISTIAN,
STR.PATRIOTILOR, NR.1, BL.PM16, SC.D,
AP.126, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BABEANU NARCISA ELENA,
STR.GHIOCEILOR, NR.7B, SAT PETREȘTI,
COMUNA CORBEANCA, IF, RO;**
• **CORNEA CĂLINA PETRUȚA,
STR.BRAȘOV, NR.25L, BL.A, SC.A1, ET.9,
AP.53, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **TULPINĂ DE *BACILLUS VELEZENSIS* CU POTENȚIAL
ENDOFIT ȘI ROL DE BIOSTIMULARE A PLANTELOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o tulpină de *Bacillus velezensis*, destinată utilizării ca inoculant microbian pentru biostimularea creșterii plantelor. Tulpina BPVs2 de *Bacillus velezensis*, conform invenției, este depozitată sub număr de colecție NCAIM(P) B 001510, a fost obținută prin selecție controlată, fără agenți mutageni, prin izolare din microbiota endofită prezentă în mod natural în semințe

de fasole. Această tulpină bacteriană prezintă capacitate de colonizare a plantelor de fasole, inclusiv potențial endofit, spectru larg de acțiune antibacteriană și antifungică, capacitate de biostimulare a creșterii plantelor, precum și toleranță la factori de stres abiotic.

Revendicări: 2



Tulpină de *Bacillus velezensis* cu potențial endofit și rol biostimulator pentru plante

Prezenta invenție se referă la o nouă tulpină de *Bacillus velezensis*, destinată utilizării ca inoculant microbial pentru biostimularea creșterii plantelor în condiții de stres fitosanitar. Această tulpină a fost obținută prin selecție controlată, fără utilizarea de agenți mutageni, fiind izolată din microbiota endofită prezentă în mod natural în semințe de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.).

În prezent interesul pentru bacteriile din specia *Bacillus velezensis* este foarte ridicat. La nivel internațional, sunt brevete un număr de tulpini de *Bacillus velezensis*, dintre care unele cu proprietăți antagoniste față de fitopatogeni și/sau activitate de stimulare a creșterii plantelor. Brevetul EP2138044A1 (A4, B1)/ 2009 se referă la un nou fungicid pe bază de *B. velezensis* tulpina AH2, depozitată sub numărul de colecție CECT-7221, condiționată sub formă lichidă, ca produs pentru protecția plantelor, cu bună stabilitate la temperatura ambientală, recomandat pentru controlul biologic al fungilor fitopatogeni și promovarea creșterii plantelor. Brevetul CN111876351A (B) / 2020 menționează *Bacillus velezensis* XC1, depozitată în colecția CGMCC sub numărul 20057, pentru efectul inhibitor față de *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* și *F. solani*, producția ridicată de enzime litice cu efect antagonist, conținut redus de acizi fenolici, recomandată pentru promovarea creșterii merilor. Brevetul CN113862194A (B)/2021 face referire la *Bacillus velezensis* tulpina wr8 și metaboliții săi cu activitate fungicidă față de *Penicillium* sp. și *Botrytis cinerea*, spectru larg antibacterian față de patogeni precum *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* și alte specii Gram negative. Tulpina este menționată pentru prevenirea infecțiilor cauzate de putregaiul tulpinii și rădăcinii la plantele *Siraitia grosvenorii*, prevenirea fuzariozei la bananieri și alte putregaiuri la citrice. De asemenea, brevetul CN112877255A (B)/ 2021 face referire la *Bacillus velezensis* YZS-M03 (număr de depozit CGMCC 20900) și modalitatea de aplicare a acestuia pentru solubilizarea fertilizanților pe bază de fosfor și potasiu, respectiv potențialul de fixare a azotului atmosferic. De asemenea, cererea de brevet US2019261633A1/ 2018 descrie tulpina *B. velezensis* NSZ-YBGJ0001, cu numărul de depozitare CGMCC 14384, ca prezentând activitate de prevenire și control a bolilor plantelor, dar și potențial de promovare a creșterii plantelor. Cererea de brevet de invenție US 20180020676 A1 / 2017 descrie tulpina *B. velezensis* RTI301 cu activitate de promovare a creșterii și potențial de inhibarea a unor agenți patogeni pentru plante. Nu s-au descris însă până acum tulpini autohtone de *B. velezensis* care să prezinte concomitent potențial de dezvoltare endofită în plantele de fasole, spectru larg de acțiune antimicrobiană, capacitate de biostimulare a creșterii plantelor, efect sinergic cu bacteriile diazotrofe, respectiv toleranță la diferiți factori abiotici de stres, precum temperatura, pH-ul și salinitatea.

Tulpina de *Bacillus velezensis* BPVs2 (număr de depozit NCAIM (P) B 001510) prezintă capacitate de colonizare a plantelor de fasole, inclusiv potențial endofit, spectru larg de acțiune antibacteriană și antifungică, capacitate de biostimulare a creșterii plantelor, totodată având toleranță la factori de stres abiotic.

Tulpina *Bacillus velezensis* BPVs2 prezintă următoarele avantaje:

- creștere bogată pe medii nutritive uzuale și pe subproduse reziduale din industria alimentară și din vinificație;
- formare de spori cu viabilitate îndelungată
- creștere în condiții de stres, precum temperatură ridicată (50°C), pH variabil (5÷11), sulfat de cupru 50 mg/L;
- spectru larg de acțiune împotriva fungilor fitopatogeni și mucegaiurilor de alterare: *Alternaria* sp., *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*;
- spectru larg de acțiune împotriva bacteriilor patogene: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus pyogenes* care ar putea contamina produsele agro-alimentare;
- capacitate de stimulare a creșterii plantelor prin solubilizarea fosforului din compuși organici, producerea de enzime degradative care eliberează nutrienți din surse organice.
- toleranță la factori de mediu extremi, precum temperatură scăzută (-20°C), temperatură ridicată (+80°C), pH acid (4,5), respectiv pH alcalin (11).

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este ilustrată prin exemplele prezentate mai jos, în care sunt descrise procedeele de punere în evidență a proprietăților tulpinii BPVs2 de *Bacillus velezensis* de a se dezvolta endofit (exemplul 1), de a inhiba creșterea fungilor fitopatogeni (exemplul 2), de a inhiba dezvoltarea contaminanților bacterieni patogeni pentru om și animale (exemplul 3), de a stimula creșterea plantelor de fasole atât în condiții normale de cultivare (exemplul 4) cât și în condiții de stres (exemplul 5).

Expunerea invenției este ilustrată distinct în cele ce urmează:

Exemplul 1. Tulpina BPVs2 a fost obținută în cadrul Facultății de Biotehnologii din Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București, din semințe de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.).

Potențialul endofit al acestei tulpini a fost evidențiat în etape de izolare, întrucât aceasta coloniza endofit semințele, în mod natural. Izolarea acestei tulpini a fost realizată prin tehnici uzuale de microbiologie, în urma dezinfectării la suprafață a materialului semincer. Pentru aceasta semințele au fost spălate, imersate în etanol de 70%, apoi dezinfectare în clorură mercurică 0,2%, timp de 15 minute sub agitare orbitală. După sterilizarea la suprafață a semințelor, dezinfectantul a fost înlăturat prin clătiri cu apă distilată sterilă. În apa ultimei clătiri nu au fost detectate microorganisme cultivabile. Semințele sterilizate la suprafață au fost mojarate aseptice, în tampon fosfat salin steril, în raport de 1: 10 (w/v). După infuzare, 0,1ml au fost etalați, cu o spatulă Drigalski sterilă, pe mediu mediul YMA, cu următoarea compoziție: manitol 10 g/l; extract de drojdii 1 g/l; fosfat bipotasic 0,5 g/l; sulfat de magneziu heptahidrat 0,2 g/l; clorură de sodiu 0,2 g/l; sulfat de calciu 0,1 g/l; sulfat de mangan 0,005 g/l; molibdat de amoniu dihidrat 0,002 g/l și agar 20 g/l, cu pH final de 7,0±0,2.

Tulpina prezintă o creștere abundentă atât pe mediu de cultură menționat, cât și pe alte substraturi nutritive uzuale pentru cultivarea bacteriilor de interes agricol precum Luria Betrani Agar nutritiv sau Geloză simplă, pe care formează colonii relativ opace, cu marginea neregulată

crenată și aspect sablat. Microscopic se prezintă ca bacili Gram pozitivi, sporulați, de 0,7...0,9 x 2...3 μm, care apar izolați sau grupați câte doi.

Identificarea taxonomică la nivel de gen a fost realizată prin corelarea caracterelor microbiologice și de microscopie, cu cele fiziologice și biochimice, determinate prin tehnica Biolog Gen III (tabelul 1).

Tabelul. 1. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii BPVs2.

Testul microbiologic	<i>Bacillus velezensis</i> BPVs2
Reacția Gram	+
Reacția Voges-Proskauer	-
Solubilizare fitat de sodiu	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza carboximetil celulozei	+
Hidroliza xilanului	-
Hidroliza cazeinei	+
Hidroliza gelatinei	+
Hidroliza argininei	+
Hidroliza ornitinei	+
Motilitate	+
Catalază	+
Surse de carbon:	
Glucoză	+
Fructoză	+
Manoză	+
Trehaloza	+
Celobioză	+
Gentiobioza	+
Sucroză	+
Sorbitol	+
Manitol	+
Toleranta la NaCl 8%	+
Notă: + reacție pozitivă, - reacție negativă	

Pentru încadrarea taxonomică la nivel de specie au fost utilizate tehnici moleculare precum secvențierea Sanger pentru gena 16S ARNr, cu înaltă conservare la bacterii, folosind primerii 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') și 1492R (5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'). Rezultatele secvențierii au fost prelucrate bioinformatic, iar secvența de nucleotide cu lungimea de 1408 pb a fost comparată cu secvențe similare disponibile în baza de date a NCBI (National Center for Biotechnology Information), folosind ca instrument bioinformatic aplicația BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Secvența de nucleotide în baza căreia tulpina BPVs2 a fost identificată la nivel de specie ca fiind *Bacillus velezensis*, se află în baza de date internațională NCBI, având numărul de acces OL762398 și următoarea secvență parțială 16S ARNr:

GTCTGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTYTGAACCGCATGGTTCA
GACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC

GGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
 TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCG
 GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
 GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
 CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGA
 CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
 TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
 CGGTGCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCG
 GGGGCGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
 CAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGT
 CTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGATACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA
 GGAGCCAG

Exemplul 2. Activitatea antifungică a tulpinii BPVs2 a fost pusă în evidență față de numeroase ciuperci patogene din sol precum *Rhizoctonia solani* și *Sclerotinia sclerotiorum*, fungi fitopatogeni care produc ofiliri, infecții foliare, pătări și alte boli ale plantelor, precum *Alternaria sp.*, *Fusarium oxysporum* și *Macrophomina phaseolina*, inclusiv putregaiuri și mucegaiuri toxigene de alterare, precum *Aspergillus sp.*, *Fusarium oxysporum* și *Penicillium sp.*

Calitățile antifungice ale tulpinii BPVs2 au fost evidențiate *in vitro* prin metoda culturilor duble, pe mediul Cartof-Glucoză-Agar (CGA). Pentru aceasta au fost utilizate vase Petri sterile, încărcate cu mediu CGA și însămânțate central cu rondele miceliene 6 mm diametru. Biomasa bacteriană a fost inoculată prin striere, la 2 cm față de inoculul fungic. Testul a fost repetat de patru ori, iar la fiecare testare au fost realizate trei repetiții. Concomitent au fost pregătite culturi fungice martor, pentru fiecare fitopatogen în parte. Plăcile astfel însămânțate au fost incubate la 25°C și analizate în primele 7 zile, în ceea ce privește eficacitatea de inhibare a creșterii miceliene. Confirmarea activității antifungice a fost evidențiată după 14 zile de incubare, prin limitarea creșterii coloniilor fungice de către tulpina bacteriană BPVs2 (tabelul 2).

Tabelul 2. Activitatea antifungică a tulpinii *Bacillus velezensis* BPVs2 față de fitopatogenii analizați

Fung fitopatogen	Eficacitatea de inhibare (%) a creșterii fungilor fitopatogeni
<i>Alternaria sp.</i>	66,4±5,5
<i>Aspergillus sp.</i>	72,5±2,1
<i>Fusarium oxysporum</i>	57,0±5,0
<i>Macrophomina phaseolina</i>	76,7±4,4
<i>Penicillium sp.</i>	76,3±4,7
<i>Rhizoctonia solani</i>	67,5±2,5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	72,1±3,0
Notă: Eficacitate este reprezentată în valori medii ± deviația standard.	

Rezultatele au demonstrat ca tulpina BPVs2 inhibă creșterea fungilor fitopatogeni testați, spectrul de acțiune fiind vast.

Exemplul 3. Tulpina *Bacillus velezensis* BPVs2 a fost testată *in vitro* pentru determinarea capacității de inhibare a creșterii unor bacterii patogene, care ar putea contamina legumele fertilizate cu gunoi de grajd. Activitatea antibacteriană a tulpinii BPVs2 a fost pusă în evidență față de numeroase bacterii patogene, precum *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus pyogenes* care ar putea contamina produsele agro-alimentare.

Calitățile antibacteriene ale tulpinii BPVs2 au fost evidențiate *in vitro* prin metoda difuzimetrică. Pentru aceasta bacteriile patogene au fost pregătite ca suspensie cu densitatea optică de 0,3 DO la 600nm, și însămânțate în proporție de 1:10 v/v în mediul Triptonă-Soia-Agar (TSA), topit și adus la temperatura de 45°C. După solidificarea agarului, tulpina BPVs2 a fost însămânțată în spoturi, pe suprafața substratului. Plăcile astfel însămânțate au fost incubate 1...2 zile la 30°C. Activitatea antibacteriană a fost evidențiată prin apariția unor halouri clare, lipsite de creștere patogenă, împrejurul coloniilor tulpinii BPVs2 (tabelul 3).

Tabelul 3. Activitatea inhibitoare a tulpinii BPVs2 față de bacterii patogene

Bacterie patogenă	<i>Bacillus velezensis</i> BPVs2	Bacterie patogenă	<i>Bacillus velezensis</i> BPVs2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+ 2 mm ^S	<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939	+ 5 mm ^S
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+ 1 mm ^T	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	+ 2 mm ^T
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+ 2 mm ^S	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+ 2 mm ^T
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+ 5 mm ^S	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	+ 3 mm ^T
Notă: S = bacteria patogenă este sensibilă la compușii inhibitori produși de tulpina BPVs2, iar creșterea este inhibată complet; T = bacteria patogenă are creșterea diminuată, însă tolerează compușii inhibitori produși de tulpina BPVs2			

Exemplul 4. Tulpina BPVs2 a fost testată *in vivo*, în condiții controlate de creștere cât și în câmp, în vederea determinării efectului biostimulator asupra plantelor de fasole. Pentru aceasta inoculările au fost realizate ca tratament la sămânță, prin imersare 30 minute în suspensie bacteriană 10⁹ ufc/ml.

În cadrul testării în condiții controlate, semințele au fost plasate în ghivece de 1,5 L în substrat pe bază de turbă și nisip fin, pH 5,7±0,5. Condițiile de creștere au asigurat o perioadă de lumină diurnă, cu 14h de iluminare solară la începutul cultivării, respectiv 16h lumină la desființarea experimentului. Temperatura ambientală fiind de 26°C pe timpul zilei, respectiv 21°C în întuneric. După 3 săptămâni de la răsărire, plantele tratate au atins talia de 22,3±0,6 cm, fiind de 1,56±0,02 ori mai înalte decât martorul netratat (14,3±0,6 cm) și au format mai multe etaje foliare (5 nivele de frunze), cu unul mai mult decât în martor. După 4 săptămâni de la răsărire plantele tratate au format boboci florali, cu 5 zile înaintea plantelor din varianta martor.

Testele efectuate în câmp au fost înființate în 22 aprilie 2022. Cultura a fost înființată prin semănat direct în cuiburi. Au fost pregătite trei variante experimentale. Tratamentul la sămânță cu tulpina bacteriană de interes, *Bacillus velezensis* BPVs2, a fost comparat cu un martor netratat și o variantă de tratament cu un produs comercial biologic aplicat la sol, conform recomandării producătorului în concentrație de 120ml produs comercial la 1L apă, respectiv în doză de 100ml soluție / cuib. Produsul comercial biologic este caracterizat drept un îngrășământ organic, 100% natural, care îmbunătățește proprietățile solului și îl îmbogățește cu substanțe nutritive, având efect biofertilizant.

Parametrii biologici urmăriți au fost: conținutul de clorofilă a și b, xantofile și caroteni (mg/g masă proaspătă) în frunze, conform protocolului descris de Lichtenhaller și Wellburn (1987); numărul de flori/plantă, numărul de păstăi/plantă, productivitatea determinată ca greutate masă proaspătă (GP) și masă uscată (GU) de păstăi, după 2 luni de la răsărire (tabelul 4).

Tabelul 4. Activitatea biostimulatoare a tratamentului la sămânță cu tulpina BPVs2 asupra plantelor de fasole.

Parametri analizați	Martor netratat	Tratament la sol cu biofertilizant comercial	Tratament la sămânță cu <i>B. velezensis</i> BPVs2
Nr. flori/ plantă	7,71 ± 3,35 b	18,86 ± 2,61 a	23,00 ± 4,76 a
Nr. păstăi/ plantă	37,14 ± 1,35 c	47,29 ± 1,38 b	65,40 ± 2,15 a
GP/pastaie < g >	6,71 ± 0,72 b	8,44 ± 0,52 a	7,81 ± 0,69 a
GU/pastaie < g >	0,64 ± 0,09 b	0,82 ± 0,10 a	0,75 ± 0,13 ab
Productivitatea după 2 luni Păstăi GP/plantă < g >	249,54 ± c	399,26 ± b	511,10 ± a
Clorofilă a <mg/g GP>	1,61 ± 0,14 a	1,69 ± 0,10 a	1,71 ± 0,03 a
Clorofilă b <mg/g GP>	0,54 ± 0,02 b	0,58 ± 0,08 ab	0,65 ± 0,05 a
Clorofilă totală <mg/g GP>	2,15 ± 0,13 a	2,27 ± 0,15 a	2,36 ± 0,06 a
Carotenoizi totali (xantofile și caroteni) <mg/g GP>	0,26 ± 0,04 a	0,23 ± 0,03 a	0,24 ± 0,02 a
Notă: Sunt prezentate valorile medii și deviația standard. GP = greutate masă proaspătă; GU = greutate masă uscată. Pentru același parametru analizat, litere diferite evidențiază valori semnificativ distincte, la $p \leq 0,5$.			

După cum se poate observa, tratamentul la sămânță cu tulpina de *Bacillus velezensis* BPVs2 a avut efecte benefice în ceea ce privește productivitatea, numărul de păstăi și flori pe plantă, comparativ martorului netratat. Rezultatele obținute cu această tulpină bacteriană, aplicată ca tratament la sămânță, au fost comparabile cu tratamentul comercial biofertilizant însă, în ceea ce privește productivitatea plantelor, tratamentul cu BPVs2 a condus la un spor de producție per plantă de 2,05 ori mai mare față de martorul netratat, respectiv de 1,28 ori mai mare față de tratamentul comercial biofertilizant.

Exemplul 5. Tulpina BPVs2 a fost supusă *in vitro*, la diferite condiții de stres abiotic, pentru a se determina potențialul de creștere la diferite valori de temperatură și pH (tabelul 5).

Tabelul 5. Toleranța tulpinii *Bacillus velezensis* BPVs2 la temperatură și pH

Factor abiotic	Parametru	Creștere	Menținere viabilitate
Temperatură	10°C	–	+
	20°C	+	+
	30°C	+	+
	40°C	+	+
	50°C	+	+
pH	5	+	+
	6	+	+
	7	+	+
	8	+	+
	9	+	+
	10	+	+
	11	+	+

Cultivarea tulpinii pe mediu uzual de creștere Luria Bertani agarizat (pH 7,0±0,2) la diferite intervale termice a arătat că tulpina își menține viabilitatea expusă la 10-50°C, însă la temperatura de 10°C rămâne în stare latentă. În schimb la temperatură ridicată (50°C) își continuă creșterea și își menține capacitatea de colonizare. Însămânțată pe substrat agarizat cu diferite valori pH 5 ... 11, tulpina bacteriană studiată și-a continuat creșterea, la temperatura de incubare de 30°C.

Avantajele invenției

Tulpina de *Bacillus velezensis* BPVs2 a demonstrat că are calități de agent de combatere biologică față de un număr mare de fungi fitopatogeni precum *Alternaria* sp., *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*. De asemenea, această tulpină bacteriană prezintă efect inhibitor asupra unor contaminanți bacterieni ai produselor vegetale (bacterii patogene pentru oameni și animale), cu potențial infecțios pentru consumatori.

Tulpina BPVs2 produce arginin- și ornitin-decarboxilaze, enzime implicate în activarea căii metabolice de sinteză a poliaminelor, compuși benefici pentru plante, care influențează în mod pozitiv creșterea, productivitatea și toleranța la factorii de stres.

Bacillus velezensis BPVs2 a dovedit că are capacitatea de a stimula creșterea și productivitatea plantelor de fasole. Tratamentul la sămânță cu această tulpină bacteriană, stimulează creșterea și productivitatea plantelor de fasole, cu un spor de producție de 28%, față de tratamentul la sol cu un biofertilizant comercial pe bază de acizi humici și huminici.

Utilizarea tulpinii BPVs2 de *Bacillus velezensis* (înscrisă în colecția de microorganisme NCAIM cu număr de depozit (P) B 001510) ca agroinoculant cu potențial endofit și rol de biostimulare a plantelor reprezintă o soluție alternativă la utilizarea produselor de sinteză chimică destinate promovării creșterii plantelor de fasole, în condiții de stres biotic și abiotic. De asemenea, această tulpină poate fi utilizată în condiții de stres termic și la diferite valori ale pH-ului, în substrat.

Revendicări

1. Tulpină de *Bacillus velezensis* BPVs2, având codul de depozitare NCAIM (P) B 001510, cu potențial endofit și rol de biostimulare a plantelor de fasole, capabilă să reducă creșterea fitopatogenilor *Alternaria* sp., *Aspergillus carbonarius*, *Asp. niger*, *Asp. ochraceus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani* și dezvoltarea contaminanților bacterieni *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.
2. Utilizarea tulpinii BPVs2 de *Bacillus velezensis* conform revendicării 1 ca agroinoculant cu potențial endofit și agent de biostimulare a creșterii plantelor.