

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată în agricultură pentru protecția plantelor de funghi și bacterii fitopatogene.

Este cunoscută tulpina de *Pseudomonas putida* BKM B-1743 pentru obținerea preparatului ce se folosește la stimularea creșterii și protecția plantelor față de unii funghi ai genului *Fusarium* și bacterii *Erwinia* [1].

Este de asemenea cunoscută o tulpină de *Pseudomonas putida* - 4308 utilizată în calitate de biostimulator al creșterii plantelor și pentru protecția plantelor atacate de bacterii fitopatogene [2].

Dezavantajele tulpinilor deja cunoscute constau în aceea că din cauza nivelului redus de sinteză a sideroforului activitatea antagonistă față de microorganismele fitopatogene, precum și influența stimuloare asupra creșterii plantelor la tulpinile menționate nu sunt suficiente de pronunțate.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unei noi tulpini de *Pseudomonas* care prin capacitatea sa de sinteză a sideroforului și, corespunzător, activitatea antagonistă împotriva microbilor nedorii ar fi fost mai oportună decât cele cunoscute.

Esența invenției constă în aceea că se propune tulpina de bacterii *Pseudomonas fluorescens* CNM PFB-01 utilizată pentru protecția plantelor de funghi și bacterii fitopatogene. Tulpina propusă este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova. Tulpina de bacterii *Pseudomonas fluorescens* ce are o capacitate mai mare de a sintetiza sideroforii în comparație cu tulpina analoagă a fost izolată din rizoplanul plantelor cultivate pe parcelele cu fond infecțios de funghi din genul *Fusarium* timp de 10 ani.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea nivelului de sinteză a sideroforilor de către tulpina propusă.

Particularitățile cultural-morfologice:

Celule baciliforme, mobile, gram-negative, nu formează spori; în mediul solid King B (g/L: peptonă - 10,0, glicerina - 20,0; K₂HPO₄ - 1,5; MgSO₄ - 1,5, apă dist. - până la 1L) formează colonii intransparențe, omogene, rotunde, netede, strălucitoare, cu margini drepte; tulpina elimină în mediul din jurul coloniilor pigmentul fluorescent galben-verde; pigment suplimentar de fenazina în mediul King A (g/L: peptonă - 10,0, glicerina - 20,0, K₂SO₄ - 10,0; MgCl₂ - 1,4; apă dist. - până la 1L) nu formează.

Cultura crește bine în următoarele medii: bulion peptonat, King B.

Particularitățile fiziologice biochimice ale tulpinii:

Microorganism strict aerob; temperatura optimă de dezvoltare 26...28°C, nu crește la 41 grade; poate să se dezvolte în limita pH 6,5...9,5. Diluează gelatina; testul pentru determinarea prezenței arginindihidrolazei este pozitiv; are capacitatea de denitrificare; nu sintetizează levanzaharoza.

Metoda, condițiile și componența mediilor pentru păstrarea îndelungată și înmulțirea tulpinii: tulpina este păstrată pe geloză înclinată a mediului King B (obținut prin adăugarea gelozei în cantitate de 15 g/L la componentele mediului lichid King B) sub ulei de vaselină în frigider.

Pentru înmulțirea tulpinii mediul și condițiile sunt asemănătoare.

Exemplul 1. Nivelul sintezei pigmentului sideroforului este determinat în felul următor: cultura este crescută în vasele Erlenmeyer (100 ml) în dispozitiv cu reglare termică pentru creșterea microorganismelor 12-250 cu aerarea 200 rot./min și temperatura 26...28°C. Componența mediului nutritiv, g/L:

K ₂ HPO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
acid succinic	4,0
apă dist.	restul.

pH este adus până la 7,0 cu hidroxid de sodiu înainte de sterilizare. În mediul lichid (50 ml) se adaugă 1-2% inocul (concentrația inițială a celulelor 100 mii cel./ml). După 48 h de creștere proba lichidului cultural (5 ml) este centrifugată la centrifuga de masă cu 5000 rot./min timp de 10 min, densitatea optică este măsurată la SF-26 la 400 nm în lichidul de deasupra sedimentului și comparată cu mediul nutritiv neinoculat.

Mediul cu acid succinic contribuie la mărirea sintezei sideroforului de aproximativ două ori. Tulpina CNM PFB-01 se caracterizează prin acumularea mai înaltă a sideroforului în mediul cu acid succinic (0,4% de masă) în comparație cu tulpina cunoscută *P.putida* M.

Exemplul 2. Activitatea antagonistă a tulpinii propuse față de funghi și bacteriile fitopatogene a fost determinată prin metoda aprofundării în geloză.

Pentru efectuarea acestui test tulpina *P. fluorescens* CNM PFB-01 este cultivată ca de obicei pe mediul lichid cu acid succinic (0,1-0,4%) până la acumularea sideroforului în cantitate ce corespunde cu 2,0 unități ale densității optice. Microorganismele fitopatogene se însămânțează în cutiile Petri pe mediile nutritive solide: funghi - pe mediu de must de malț agarizat, bacteriile - pe geloză King B. Apoi cu ajutorul unui cilindru metalic în mediul însămânțat se fac adâncituri cu diametrul de 8 mm. În adâncituri se introduce câte 0,2 ml de lichid cultural al pseudomadei propuse. Cutiile se termostatează la 28°C timp de 2...3 zile, apoi se măsoară diametrele zonelor de inhibare a test-microbilor.

Lichidul cultural al tulpinii *P.fluorescens* CNM PFB-01 posedă o activitate pronunțată atât anti-micotică cât și antibacteriană.

Exemplul 3. Semințele de castraveți de soiul *Mirabella*, câte 12 în cutie, se înmoaie în 10 ml de soluție diluată 1:100 și 1:200 a lichidului cultural *P.fluorescens* CNM PFB-01 (mediul cu acid succinic) timp de 18 ore. Înainte de aceasta lichidul cultural este standardizat după cantitatea sideroforului până la 2,0 unități ale densității optice la 400 nm la spectrofotometrul SF-26. Apoi semințele sunt uscate pe hârtie de filtru timp de 3 ore și semănate în vasele de vegetație cu 5 kg de sol la adâncimea de 5 cm.

Tratarea semințelor cu lichidul cultural diluat al tulpinii *P.fluorescens* CNM PFB-01 sporește germinația lor cu 21-25%. În afară de aceasta, se mărește autentic lățimea frunzelor și masa rădăcinilor. Rosta potențială, de asemenea, este mai mare în variantele de experiență: de exemplu, la diluarea 1:200 se mărește cu 29% față de martor.