

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică. La un procedeu care duce la stimularea activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* asupra diferitor tulpini de fungi fitopatogeni ca: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger* ce provoacă diferite boli la plantele de cultură. Datorită capacității de sporire a activității antifungice, procedeu poate fi utilizat la conservarea microorganismelor pe un termen îndelungat și utilizarea acestora ca agenți de protecție a plantelor de cultură de infectarea cu fitopatogeni.

Afectarea plantelor de cultură de către fitopatogeni duce la scăderea productivității lor, la micșorarea recoltei, precum și la diminuarea calității produsului obținut. Utilizarea microorganismelor în calitate de agenți cu proprietăți antimicrobiene pronunțate asupra fitopatogenilor permite atât majorarea productivității plantelor, cât și îmbunătățirea calității produsului.

În prezent este cunoscut un procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 asupra fungilor fitopatogeni în urma liofilizării, utilizând ca mediu protector succinat de Na + 12% zaharoză, în rezultatul căruia, după 6 ani de păstrare, zonele de inhibiție a patogenilor au atins valori de 15,0...25,0 mm, în dependență de test-cultura studiată [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că proprietățile antifungice sunt slabe și mai puțin pronunțate după păstrarea îndelungată.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de stimulare a activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, în urma liofilizării, cu utilizarea unui mediu protector ce asigură stimularea proprietăților antifungice asupra fitopatogenilor, după 6 ani de păstrare.

Procedeu revendicat constă în conservarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 cu capacitate antifungică prin liofilizarea acesteia, utilizând mediul de protecție lapte degresat + 12% zaharoză. Zonele de inhibiție a creșterii fitopatogenilor, după 6 ani de la conservare, ating valori de 31,0 mm pentru *Fusarium oxysporum*, 33,7 – *Fusarium solani*, 30,7 – *Alternaria alternata*, 28,7 – *Botrytis cinerea* și 24,3 mm – *Aspergillus niger*.

Procedeu de conservare a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* cu activitate antifungică prevede cultivarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 pe un mediu nutritiv în decurs de 48 ore la temperatura de 28...30°C, resuspendarea într-un mediu constituit din lapte degresat și 12% de zaharoză cu un titru de 10^{-8} ... 10^{-9} , congelarea rapidă la temperatura de -20°C, liofilizarea și păstrarea la temperatura de +4°C.

Rezultatul constă în majorarea activității antifungice a tulpinii după păstrare, și anume stimularea evidentă a proprietăților antifungice asupra fitopatogenilor *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger* după 6 ani de păstrare, acestea fiind mai înalte față de soluția cea mai apropiată. Zonele de inhibiție a creșterii fitopatogenilor obținute în rezultatul liofilizării, cu utilizarea mediului protector succinat de Na + 12% zaharoză (soluția cea mai apropiată), variază de la 15,0...25,0 mm pentru tulpinile *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. alternata*, *B. cinerea* și *A. niger*, iar zona de inhibiție determinată cu utilizarea procedurii propus în invenție variază între 24,3...33,7 mm, ceea ce depășește de până la 1,62 ori caracteristicile analoge obținute conform celei mai apropiate soluții.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că, în calitate de mediu protector pentru liofilizarea tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 se utilizează lapte degresat + 12% zaharoză. Proprietățile antifungice evidente sunt asigurate datorită resuspendării tulpinii în mediul dat, care asigură un efect protector față de șocurile osmotice și termice și nu permite acestora de a influența negativ sinteza metaboliților cu activitate antifungică.

Exemplu de realizare a invenției

Se prepară mediul nutritiv agarizat King B cu următorul conținut al ingredientelor: peptonă – 20,0 g; glicerină – 15,0 mL; K_2HPO_4 – 1,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,5 g; agar – 15,0 g; apă distilată până la 1,0 litru; pH-ul = 7,0 – 7,2. Pe mediul preparat, în tuburi înclinate, se reînsămânțează tulpina *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, după 48 ore de incubare la +28...30°C, cultura se resuspendă în mediul protector lapte degresat + 12% zaharoză până la titrul de 10^{-8} ... 10^{-9} , se repartizează câte 1,0...2,0 mL de suspensie în flacoane și se congelează rapid la -20°C, după care probele se liofilizează. Probele liofilizate sunt sigilate și plasate în frigider la temperatura de +4°C. După 6 ani de conservare în stare liofilizată tulpina se reînsămânțează pentru a determina activitatea antifungică.

Paralel se pregătesc culturile de fungi fitopatogeni care sunt inoculate pe mediul Czapek cu următoarea componență (g/L): zaharoză – 30,0; $NaNO_3$ – 3,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4$ – 0,01; agar – 20,0; apă distilată până la 1,0 litru; pH-ul = 7,0...7,2. Suspensia de spori a fungilor fitopatogeni cu titrul 10^{-7} ... 10^{-8} se reînsămânțează submers în plăcile Petri.

Determinarea activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 după 6 ani de la liofilizare pe mediul protector lapte degresat + 12% zaharoză a fost efectuată conform metodei de difuziune a metaboliților prin utilizarea discurilor de geloză. În calitate de culturi de referință în experimentul *in vitro* au fost folosite tulpinile fitopatogene de micromicete: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger*. După 4...5 zile de incubare se măsoară zonele de inhibiție aparente în jurul discurilor de geloză.

Proprietățile antifungice pronunțate depistate în urma elaborării procedurii de conservare și stimulare a activității antifungice a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 asupra fitopatogenilor prezintă interes din

punct de vedere al extinderii arsenalului de microorganisme cu capacitate antifungică pronunțată, cu utilizarea acestora ca agenți de prevenire și protejare a plantelor de cultură.

Rezultatele studiului activității antifungice după 6 ani de conservare, în urma liofilizării tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07 utilizând ca mediu protector laptele degresat + 12% zaharoză, sunt prezentate în tabel, care relevă o activitate mai sporită față de cea mai apropiată soluție. Astfel, datele experimentale obținute demonstrează că procedeul revendicat manifestă activitate antifungică mai sporită față de fitopatogenii *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* și *Aspergillus niger*, care depășește de până la 1,62 ori caracteristicile analoage ale procedurii descris în cea mai apropiată soluție.

Tabel

Activitatea antifungică a tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, după 6 ani de conservare în stare liofilizată conform procedurii propus în invenție și celei mai apropiate soluții

| | Metoda utilizată | Zona de inhibiție a fungilor fitopatogeni (mm) | | | | |
|--------------------------------------|--|--|------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium solani</i> | <i>Alternaria alternata</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| Conform celei mai apropiate soluții | Liofilizarea pe mediul succinat de Na + 12% zaharoză | 23,0±1,1 | 25,0±1,1 | 19,3±1,3 | 23,7±1,7 | 15,0±1,1 |
| Conform soluției propuse în invenție | Liofilizarea pe mediul lapte degresat + 12% zaharoză | 31,0±1,1 | 33,7±1,7 | 30,7±1,3 | 28,7±2,4 | 24,3±1,7 |

Datele din tabel demonstrează că zonele de inhibiție determinate conform procedurii propus în invenție sunt mai mari și le depășesc de până la 1,62 ori pe cele descrise în cea mai apropiată soluție.

Proprietățile depistate ale tulpinii *Bacillus cereus* var. *fluorescens* CNMN-BB-07, liofilizată conform procedurii revendicat, prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de preparate cu acțiune antifungică pronunțată asupra fungilor fitopatogeni – dăunători ai plantelor de cultură.