

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**EVALUAREA POTENȚIALULUI BIOTEHNOLOGIC AL
TULPINILOR *BACILLUS SAFENSIS* P1.5S ȘI *BACILLUS*
VELEZENSIS P3.3S ÎN CONDIȚII DE STRES ABIOTIC PRIN
ANALIZE FUNCȚIONALE ȘI GENOMICE**

Rezumat teză de doctorat

**Coordonator științific,
Prof. univ. dr. habil. Marius ȘTEFAN**

**Student-doctorand,
Loredana-Elena MANTEA**

Iași, 2025

INTRODUCERE

Agricultura reprezintă unul dintre cele mai importante sectoare economice, având un rol esențial în asigurarea securității alimentare la nivel global. Potrivit estimărilor Organizației Națiunilor Unite, populația mondială va ajunge la aproximativ 9,7 miliarde de locuitori până în anul 2050, ceea ce va impune o creștere a producției alimentare cu până la 70% pentru a putea satisface cererea tot mai ridicată de hrană (United Nations, 2019; Kumar et al., 2021). Această provocare este intensificată de schimbările climatice, considerate una dintre cele mai grave probleme globale cu impact direct asupra agriculturii durabile (Banca Mondială, 2021). Efectele asociate, precum creșterea temperaturilor medii, episoadele de secetă, fenomenele meteorologice extreme, creșterea nivelului mării și concentrațiile ridicate de dioxid de carbon, afectează negativ atât cantitatea cât și calitatea producției agricole, punând în dificultate eforturile de a asigura o alimentație suficientă și sănătoasă pentru populația umană aflată în continuă creștere (Kumar et al., 2021).

Schimbările climatice au produs deja efecte vizibile asupra producției globale de alimente, întrucât productivitatea și randamentele estimate ale principalelor culturi de bază au înregistrat scăderi în toate regiunile lumii (Arora, 2019; Ray et al., 2019). Mai mult, conform Grupului Interguvernamental de Experți privind Schimbările Climatice, până la sfârșitul secolului XXI se anticipează pierderea sau degradarea unor suprafețe semnificative de terenuri agricole fertile din cauza efectelor climatice negative (Calvin et al., 2023). Un impact important al acestor schimbări constă și în scăderea disponibilității nutrienților esențiali din sol, ceea ce contribuie suplimentar la diminuarea eficienței sistemelor agricole (Haque et al., 2020). Fosforul (P) este unul dintre cei mai importanți macronutrienți, fiind esențial pentru creșterea și dezvoltarea plantelor (Wan et al., 2020). Cu toate acestea, din cauza solubilității sale reduse, disponibilitatea P poate fi limitată în multe soluri, cu efecte semnificative asupra creșterii plantelor și productivității agricole. Pe lângă deficitul de nutrienți, stresul biotic generat de modificările climatice – prin intensificarea apariției buruienilor invazive, a dăunătorilor și a bolilor – accentuează presiunile asupra producției agroalimentare, afectând stabilitatea și sustenabilitatea acesteia (Haque et al., 2020).

În acest context, agricultura modernă s-a orientat preponderent către utilizarea intensivă a îngrășămintelor chimice și a pesticidelor pentru a spori randamentul culturilor (Cao et al., 2018). Totuși, aplicarea necontrolată și în exces a acestor produse agrochimice a generat consecințe grave asupra mediului, printre care se numără poluarea solului și a apelor, respectiv degradarea ecosistemelor naturale. Ca răspuns la aceste provocări, agricultura viitorului propune soluții sustenabile, printre care se evidențiază utilizarea microorganismelor benefice. Acestea pot acționa atât ca biofertilizatori, cât și ca biopesticide, contribuind la îmbunătățirea fertilității solului, la mobilizarea nutrienților esențiali, la creșterea rezistenței plantelor în fața stresului abiotic indus de

schimbările climatice, precum și la combaterea agenților fitopatogeni și bolilor care afectează culturile agricole (Ali și Glick, 2019).

Bacteriile asociate rădăcinilor joacă un rol esențial în promovarea creșterii plantelor și în ameliorarea stresului, prin intermediul unor mecanisme de acțiune directe și indirecte. Mecanismele directe se referă la creșterea absorbției de nutrienți prin fixarea azotului, solubilizarea fosforului și secreția de siderofori, fitohormoni sau producția de 1-aminociclopropan-1-carboxilat deaminază, precum și inducerea rezistenței sistemice. Mecanismele indirecte sunt mediate de suprimarea agenților fitopatogeni prin producerea de substanțe antimicrobiene, enzime litice și competiția pentru colonizarea nișei ecologice (Sun et al., 2022).

Eficiența bacteriilor care stimulează creșterea plantelor poate fi influențată de modificările climatice. Prin urmare, tulpinile bacteriene utilizate în agricultură ar trebui să prezinte o toleranță ridicată la stresul abiotic (precum salinitatea, seceta, temperaturile extreme, variațiile de pH), pentru a putea fi aplicate eficient în soluri afectate de schimbările climatice. Totodată, manifestarea efectelor benefice asupra plantelor este condiționată de colonizarea eficientă a rădăcinilor plantelor în condiții de stres. Colonizarea este un proces complex, care implică o serie de mecanisme: chemotaxie (orientarea în funcție de semnalele chimice emise de rădăcină), motilitate (capacitatea de deplasare), *quorum sensing* (comunicarea intercelulară bacteriană) și formarea de biofilme (Dong et al., 2022).

În contextul modificărilor climatice, bacteriile care pot stimula creșterea plantelor și sunt tolerante la stresul abiotic pot reprezenta o alternativă sustenabilă și eficientă pentru agricultura modernă. Bacteriile asociate rizosferei pot asigura o creștere optimă a plantelor în condiții de stres prin mecanisme precum solubilizarea fosforului și combaterea agenților fitopatogeni. O înțelegere mai profundă a acestor procese este esențială pentru asigurarea unei producții agricole sustenabile în condițiile schimbărilor climatice.

Creșterea continuă a populației globale impune găsirea unor soluții sustenabile care să mențină productivitatea agricolă și să asigure necesarul tot mai mare de hrană, în ciuda efectelor negative ale schimbărilor climatice. Utilizarea bacteriilor rizosferice tolerante la stres abiotic poate reprezenta o posibilă soluție pentru stimularea creșterii plantelor în condiții nefavorabile, contribuind astfel la securitatea alimentară într-un context agricol tot mai instabil.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE STUDIULUI

Scopul prezentei lucrări l-a constituit evaluarea în condiții de stres abiotic a mecanismelor implicate în stimularea creșterii plantelor, prezente la două tulpini bacteriene aparținând genului *Bacillus*. În acest sens, s-au utilizat abordări funcționale și genomice pentru stabilirea potențialului biotehnologic al tulpinilor investigate. În vederea îndeplinirii acestui scop s-au formulat 6 obiective principale, fiecare având asociate activități specifice:

1. *Screening-ul unor tulpini bacteriene cu potențial de stimulare a creșterii plantelor*

- 1.1. Izolarea și caracterizarea unor tulpini bacteriene care solubilizează $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 1.2. Evaluarea potențialului de solubilizare a $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de către tulpinile bacteriene izolate
- 1.3. Investigarea unor mecanisme implicate în solubilizarea $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 1.4. Evidențierea producerii de acid indolil – 3 – acetic
- 1.5. Analiza capacității de producere a 1 – aminociclopropan – 1 – carboxilat deaminază
- 1.6. Evaluarea activității antifungice a tulpinilor bacteriene
- 1.7. Aprecierea calitativă a producerii de siderofori
- 1.8. Evidențierea capacității tulpinilor bacteriene de a forma biofilm
- 1.9. Selectarea unor tulpini bacteriene ce prezintă multiple mecanisme de stimulare a creșterii plantelor

2. *Analiza genomică a tulpinilor bacteriene selectate și identificarea taxonomică*

- 2.1. Extracția și secvențierea ADN-ului genomic al tulpinilor bacteriene P3.3S și P1.5S utilizând tehnologia *Next Generation Sequencing*
- 2.2. Asamblarea *de novo* a genomurilor bacteriene
- 2.3. Identificarea taxonomică a tulpinilor de interes și analiza filogenomică
- 2.4. Annotarea funcțională a genomurilor bacteriene

3. *Investigarea activității antimicrobiene a tulpinilor bacteriene *Bacillus velezensis* P3.3S și *Bacillus safensis* P1.5S*

- 3.1. Identificarea grupurilor de gene responsabile de biosinteza unor metaboliți secundari cu potențială activitate antimicrobiană
- 3.2. Identificarea lipopeptidelor extracelulare prin spectrometrie de masă

3.3. Evaluarea activității antimicrobiene prin metoda difuzimetrică

3.4. Determinarea influenței stresului abiotic asupra activității antimicrobiene a tulpinii *B. velezensis* P3.3S

4. Evaluarea efectului factorilor de stres abiotic asupra mecanismelor implicate în colonizarea rădăcinilor la tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S

4.1. Identificarea genelor implicate în colonizarea rădăcinilor în genomul tulpinii *B. velezensis* P3.3S

4.2. Aprecierea proprietăților chemotactice ale tulpinii *B. velezensis* P3.3S

4.3. Evidențierea motilității tulpinii bacteriene *B. velezensis* P3.3S

4.4. Cuantificarea formării de biofilme

4.5. Analiza biofilmului format folosind microscopia electronică cu baleiaj

4.6. Vizualizarea biofilmului format cu ajutorul microscopiei confocale cu scanare laser

4.7. Aprecierea hidrofobicității suprafeței celulare prin aderența de hidrocarburi

4.8. Determinarea conținutului total de carbohidrați

5. Investigarea impactului factorilor abiotici asupra creșterii bacteriene și mecanismelor implicate în solubilizarea fosforului la tulpina *Bacillus safensis* P1.5S

5.1. Identificarea genelor implicate în solubilizarea compușilor cu fosfor și a genelor ce conferă toleranță la stresul abiotic

5.2. Aprecierea efectelor stresului abiotic asupra multiplicării tulpinii *B. safensis* P1.5S într-o cultură discontinuă asincronă

5.3. Evidențierea potențialului de solubilizare al tulpinii *B. safensis* P1.5S în condiții de stres abiotic

5.4. Evaluarea efectelor stresului abiotic asupra mecanismelor implicate în solubilizarea fosforului

6. Analiza și interpretarea datelor obținute. Diseminarea rezultatelor

6.1. Utilizarea testelor statistice pentru analiza și interpretarea rezultatelor.

6.2. Redactarea rapoartelor științifice

6.3. Participarea la manifestări științifice naționale și internaționale

6.4. Redactarea articolelor științifice în vederea publicării

6.5. Redactarea tezei de doctorat

CAPITOLUL I. INFLUENȚA MICROORGANISMELOR RIZOSFERICE ASUPRA PLANTELOR

Securitatea alimentară este considerată un concept complex care presupune ca întreaga populație mondială să aibă acces în orice moment la alimente suficiente, sigure și accesibile. Ținând cont de faptul că planeta se confruntă cu o serie de provocări precum schimbările climatice, scăderea biodiversității, dar și creșterea populației globale, securitatea alimentară devine din ce în ce mai fragilă și mai greu de realizat (FAO, 2019). Astfel, asigurarea securității alimentare devine unul dintre obiectivele cheie din cadrul Agendei 2030 pentru dezvoltare durabilă, adoptată de Organizația Națiunilor Unite (United Nations, 2015).

Plantele joacă un rol fundamental în securitatea alimentară globală, reprezentând principala sursă de hrană pentru oameni. Conform studiilor, peste 80% din necesarul alimentar al populației mondiale este asigurat de plante. Pe lângă faptul că furnizează o gamă vastă de produse alimentare indispensabile vieții, plantele constituie și o resursă esențială pentru producția animalieră, constituind surse de furaje pentru creșterea animalelor destinate consumului uman (FAO, 2017; Rizzo et al., 2021).

Solul asigură creșterea plantelor prin furnizarea de substanțe nutritive și apă, precum și prin forța fizică necesară susținerii acestora. Interacțiunile dintre plante și sol au loc la nivelul sistemului radicular, considerat o parte vitală a plantei. Astfel, volumul de sol din jurul rădăcinilor plantelor formează o structură distinctă cu pori și interfețe care reprezintă sediul a numeroase interacțiuni plante – microorganisme – sol (Mueller et al., 2024).

1.1. RIZOSFERA PLANTELOR

Termenul de „rizosferă” a fost definit pentru prima dată de cercetătorul german Lorenz Hiltner în anul 1904 (Berg și Smalla, 2009; Bakker *et al.*, 2013). Rizosfera reprezintă porțiunea de sol din jurul rădăcinilor, care este direct influențată de activitățile fiziologice și metabolice ale plantelor. Această zonă găzduiește cea mai mare densitate de microorganisme din sol, incluzând fungi, protozoare și alge, considerându-se că un gram de rădăcină poate conține până la 10^{11} celule microbiene (Balestrini et al., 2015). Cel mai abundent grup de microorganisme prezent în sol este însă reprezentat de bacterii. Datorită capacității lor remarcabile de a coloniza rădăcinile, bacteriile pot influența semnificativ procesele fiziologice ale plantelor, precum și ale altor categorii de microorganisme (Kumar et al., 2020).

Rizosfera a fost împărțită în trei zone (Prashar et al., 2014):

- **endorizosfera** se referă la zona internă a rădăcinii plantei și include porțiuni din cortex și endoderm în care microorganismele pot ocupa „spațiul liber” dintre celule (spațiul apoplastic);
- **rizoplanul** este reprezentat de zona imediată din jurul rădăcinii, ce include epiderma rădăcinii și mucilagiul; este locul în care rădăcinile plantei interacționează activ cu solul și cu microorganismele;
- **ectorizosfera** se referă la zona mai extinsă (câțiva mm) din jurul rizosferei care cuprinde solul ce înconjoară rădăcinile.

1.2. EXSUDATELE RADICULARE ȘI COLONIZAREA RĂDĂCINILOR DE CĂTRE MICROORGANISME

Pe parcursul proceselor de creștere și dezvoltare, o gamă largă de compuși organici este eliberată din rădăcină prin procese de exsudare, secreție și depunere. Datorită celor trei procese ce au loc la nivelul rădăcinii, zona rizosferică devine bogată în nutrienți care pot atrage microorganisme benefice ce pot îmbunătăți creșterea și dezvoltarea plantelor. În urma procesului de fotosinteză, plantele eliberează între 11 – 40% din compușii rezultați sub formă de exsudate radiculare, formate din substanțe cu greutate moleculară diferită. Compușii cu greutate moleculară mică sunt reprezentați de molecule precum zaharuri (arabinoză, deoxiriboză, fructoză, galactoză, glucoză, maltoză, manoză, riboză, sucroză și xiloză), acizi organici (acetic, butiric, citric, fumaric, glicolic, lactic, malic, oxalic, propionic, succinic, tartric și valeric), aminoacizi, alcoolii, compuși organici volatili, dar și alți metaboliți secundari (Tate, 2021; Chen și Liu, 2024).

Cercetările privind procesul de colonizare a rădăcinilor plantelor de către bacterii au înregistrat progrese semnificative în ultimii ani. Astfel, s-a demonstrat că acest proces este unul complex, ce presupune mai multe etape succesive: motilitate, chemotaxie și formare de biofilm (Liu et al., 2024).

Motilitatea. Dispersia și migrarea sunt procese ecologice fundamentale care permit bacteriilor să exploreze noi nișe, să evite condițiile de mediu neprielnice și să reducă competiția pentru nutrienți (Tecon și Or, 2016). Există mai multe strategii pe care bacteriile le utilizează pentru a se deplasa activ în mediile de creștere, forțele motile fiind mediate de flageli și pili. Pili asigură motilitatea pe suprafețe prin extensie, aderență și retracție, în timp ce flagelii sunt structuri elicoidale rigide, ancorate în peretele celular care se rotesc pentru a produce un impuls (Aroney et al., 2021). În funcție de disponibilitatea nutrienților și de gradul de competiție de la nivelul solului, motilitatea bacteriană se poate realiza într-o varietate de moduri. Astfel, la bacterii s-au descris mai multe tipuri de motilitate: *swimming*, *swarming*, *twitching*, *gliding* și *sliding* (Yang și van Elsas, 2018).

Interacțiunile ce se stabilesc în regiunea rizosferică se bazează pe recrutarea de către plante a microorganismelor benefice. Unul dintre mecanismele utilizate de către bacterii pentru a localiza o potențială gazdă este **chemotaxia**, respectiv deplasarea activă directă spre sau departe de moleculele

de semnalizare (Keren et al., 2024). Chemotaxia reprezintă abilitatea înăscută a bacteriilor de a detecta și răspunde la diverși compuși chimici prezenți în rizosfera plantelor, fiind o etapă esențială în procesul de colonizare a rădăcinilor (Xu et al., 2024). Acest mecanism permite bacteriilor să se orienteze și să se deplaseze către surse specifice de nutrienți sau semnale chimice emise de plante, facilitând astfel interacțiunea lor cu zona rizosferică (Chen și Liu, 2024; Keren et al., 2024).

Sistemul *quorum sensing* (QS) joacă un rol important în interacțiunile de tipul plante – bacterii, respectiv bacterii – bacterii. *Quorum sensing* reprezintă un sistem de comunicare bacteriană ce se realizează pe cale chimică și care se bazează pe producerea, detectarea și răspunsul celulelor la moleculele de semnalizare, numite autoinducători. Acest sistem permite grupurilor de bacterii să își modifice în sincron comportamentul ca răspuns la schimbările ce au loc în densitatea populației și în diversitatea speciilor din comunitatea vecină (Mukherjee și Bassler, 2019).

Biofilmele reprezintă ansambluri de celule microbiene care aderă la o suprafață biotică sau abiotică și care sunt înglobate într-o matrice polimerică extracelulară. Biofilmul prezintă o structură extrem de complexă, eterogenă și tridimensională compusă din microcolonii formate din celule microbiene într-o proporție de 10 – 25% și din matricea biofilmului care poate reprezenta până la 90%. Organizarea structurală a biofilmelor este extrem de avantajoasă pentru celulele microbiene conferindu-le o rezistență mai mare în condiții de stres, cum ar fi: deficitul de apă, fluctuațiile de temperatură, pH-ul acid sau alcalin, salinitatea ridicată, deficitul de nutrienți, agenții antimicrobieni, radiațiile UV, substanțele chimice toxice și mediile contaminate (Mishra et al., 2022).

1.3. MECANISME DE STIMULARE A CREȘTERII PLANTELOR

În cadrul microbiomului rizosferei, majoritatea bacteriilor au o interacțiune pozitivă cu plantele și promovează creșterea și supraviețuirea acestora, doar o mică parte dintre ele fiind considerate fitopatogene (Hakim et al., 2021). Bacteriile care pot exercita efecte benefice asupra proceselor de creștere și dezvoltare ale acestora sunt cunoscute sub numele de „rizobacterii care stimulează creșterea plantelor” – PGPR (engl. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Singh et al., 2019).

PGPR acționează prin intermediul unor mecanisme directe și indirecte (Zaidi et al., 2014; Aarab et al., 2019). Mecanismele directe sunt reprezentate de fixarea azotului, solubilizarea fosforului și potasiului, mineralizarea fosfaților organici și producerea de fitohormoni. Printre mecanismele indirecte se numără producerea de substanțe cu activitate antimicrobiană, polizaharide, siderofori și enzime (Pandey et al., 2019; Wang et al., 2020).

1.3.1. Mecanisme directe

1.3.1.1. Solubilizarea compușilor cu fosfor

Solubilizarea fosforului, una dintre cele mai importante activități de stimulare a creșterii plantelor, se realizează prin intermediul unor populații microbiene ce poartă numele de microorganisme care solubilizează fosforul (PSM) (Zaidi *et al.*, 2014; Aarab *et al.*, 2019).

Solubilizarea fosforului anorganic de către microorganisme apare în principal în urma producerii de acizi organici. Aceștia sunt produși în timpul metabolismului microbial, mai ales prin respirație oxidativă sau prin fermentație atunci când glucoza este utilizată ca sursă de carbon (Prabhu *et al.*, 2019). Eficiența procesului de solubilizare depinde de tipul acizilor organici eliberați în mediu precum și de concentrația acestora. În plus, calitatea acizilor organici produși este mai importantă pentru solubilizarea fosforului decât cantitatea totală de acizi organici (Scervino *et al.*, 2010). Secreția de acizi organici determină o scădere a pH-ului solului, chelează cationii (în principal calciu) legați de fosfat prin grupările hidroxil și carboxil sau concurează cu fosfatul pentru situsurile de adsorbție, ceea ce duce la o creștere a solubilității și disponibilității fosfaților minerali (Wei *et al.*, 2018). Acizii organici precum acidul acetic, lactic, malic, oxalic, succinic, citric, gluconic pot forma complexe cu fierul și aluminiul din fosfații ferici și de aluminiu; astfel fosforul se eliberează în sol și devine accesibil plantelor (Behera *et al.*, 2014).

Microorganismele care solubilizează fosforul sunt capabile să disocieze compușii anorganici cu fosfor, însă intervin și în mineralizarea formelor organice. Enzimele ce intervin în mineralizarea compușilor organo-fosforici sunt reprezentate de fosfataze nespecifice, fitaze și liaze. Fosfatazele non-specifice determină hidroliza esterilor și anhidridelor acidului fosforic. Cele mai bine studiate și abundente fosfataze sunt fosfomonoesterazele (numite și fosfohidrolaze sau mai simplu fosfataze). Fosfatazele se clasifică în funcție de pH-ul solului în fosfataze acide și alcaline. Fosfatazele acide predomină în solurile acide, în timp ce fosfatazele alcaline sunt mai abundente în solurile neutre și alcaline (Rawat *et al.*, 2020).

1.3.1.2. Producerea de regulatori de creștere

Fitohormonii (regulatorii de creștere) sunt substanțe organice, care la concentrații foarte scăzute (< 1 mM) sunt capabile să stimuleze, să inhibe sau să modifice creșterea și dezvoltarea plantelor (Gouda *et al.*, 2018). Rizobacteriile sunt implicate în stimularea creșterii și dezvoltării plantelor prin intermediul unor regulatori de creștere precum: auxine, gibereline, citochinine, etilena și acidul abscisic (Singh *et al.*, 2019). Acidul indolil-3-acetic (IAA) reprezintă cea mai importantă auxină care intervine în procesele fiziologice ale plantelor. Acidul indolil-3-acetic este implicat în numeroase procese, cum ar fi: diviziunea și diferențierea celulară, fotosinteza și producerea de pigmenți asimilatori, dezvoltarea xilemului, îmbunătățirea germinării semințelor, inducerea formării

rădăcinilor laterale și adventive, reglarea creșterii vegetative și conferirea rezistenței plantelor la factorii de stres (Singh et al., 2019). Cel mai important aminoacid care este eliminat de către celulele radiculare este triptofanul - principala moleculă implicată în calea biosintetică a IAA.

Etilena este cea mai simplă moleculă produsă de către plante, fiind implicată într-o serie de activități biologice, inducând modificări fiziologice la nivel molecular. Principalele funcții se referă la: germinarea semințelor, dezvoltarea perilor radiculari, senescența florilor, coacerea fructelor, căderea frunzelor. Calea de biosinteză a etilenei presupune conversia enzimatică a S-adenozil-metioninei în acid 1-aminoaciclopropan-1-carboxilic (ACC) sub acțiunea ACC sintetazei, urmată de conversia ACC-ului la etilenă catalizată de enzima ACC oxidaza. Atunci când este prezentă în concentrații ridicate, etilena exercită un efect negativ asupra plantelor. Bacteriile din sol pot produce o enzimă, 1-aminociclopropan-1-carboxilat deaminaza, care metabolizează acidul 1-aminociclopropan-1-carboxilic, precursorul direct al etilenei, în α -ketobutirat și amoniac, moderând în acest fel nivelul de etilenă din plante (Kundan et al., 2015).

1.3.2. Mecanisme indirecte

1.3.2.1. Producerea de siderofori

Microorganismele producătoare de siderofori sunt capabile să prevină sau să diminueze proliferarea agenților fitopatogeni prin reducerea cantității de fier disponibil în mediu. Sideroforii bacterieni au o afinitate foarte ridicată pentru ionul de Fe^{3+} prezent în zona rizosferică a plantei gazdă, rezultând o inhibare a dezvoltării fitopatogenilor datorită indisponibilității fierului necesar. Eficiența biocontrolului se bazează pe faptul că sideroforii bacterieni se leagă mai rapid de fier, spre deosebire de sideroforii produși de către fungi (Olanrewaju et al., 2017).

1.3.2.2. Producerea de substanțe antimicrobiene și enzime litice

Substanțele antimicrobiene produse de microorganisme sunt metaboliți secundari ce aparțin unor grupuri eterogene de compuși organici cu greutate moleculară mică ce sunt dăunători pentru creșterea sau activitățile metabolice microbiene. Aceștia sunt sintetizați și eliberați în mediul înconjurător în cantități mici (Mercado-Blanco et al., 2019). La speciile genului *Bacillus* au fost studiate în special lipopeptidele, cum ar fi iturinele, surfactinele și fengicinele, iar în cazul genului *Pseudomonas* au fost studiate DAPG (2,4-diacetilfloroglucinol), pirrolnitrina și fenazina (Mercado-Blanco et al., 2019). Bacteriile rizosferice sintetizează o serie de enzime litice, cum ar fi: chitinaze, celulaze, 1,3 – glucanaze, proteaze și lipaze care pot produce liza pereților celulari ai unor ciuperci fitopatogene (Kundan et al., 2015).

CAPITOLUL II. EFECTUL FACTORILOR DE STRES ASUPRA PLANTELOR ȘI MICROORGANISMELOR

II.1. INFLUENȚA STRESULUI ABIOTIC ȘI BIOTIC ASUPRA PLANTELOR

II.1.1. pH-ul solului

pH-ul solului reprezintă un factor abiotic cheie care influențează semnificativ biologia și procesele fizico-chimice care au loc la acest nivel. În mod evident, productivitatea solului și a culturilor agricole este dependentă de pH. Atât solul acid, cât și cel alcalin pot provoca o serie de efecte negative asupra creșterii și dezvoltării plantelor. Astfel, variațiile extreme de pH afectează semnificativ absorbția nutrienților și toate celelalte procese care au loc la nivelul solului. Solurile acide se remarcă prin deficitul de nutrienți, cum ar fi: fosforul, magneziul, calciul, molibdenul, dar și de toxicitatea cauzată de aluminiu, fier și mangan (Msimbira și Smith, 2020). Printre nutrienții a căror disponibilitate este afectată de stresul alcalin se numără fosforul, fierul, cuprul, borul și zincul (Singh et al., 2018).

II.1.2. Temperatura

Stresul termic (temperaturi ridicate și scăzute față de valoarea optimă) reprezintă principalul factor abiotic care afectează creșterea și dezvoltarea plantelor, inducând modificări morfologice, fiziologice și biochimice la plante. Temperaturile ridicate induc o serie de efecte negative, precum: scăderea conținutului de apă, stabilitatea membranei celulare și a ratei fotosintezei, modificări hormonale. Mai mult decât atât, stresul termic este asociat cu producerea de specii reactive de oxigen (ROS) care sunt foarte toxice, determinând deteriorarea proteinelor, lipidelor, carbohidraților și ADN-ului, ceea ce duce în final la moartea celulelor (Waraich et al., 2012). De asemenea, impactul temperaturii scăzute asupra plantelor depinde de rata de răcire, timpul de expunere și de alți factori de stres asociați. Unul dintre efectele pe care le provoacă fenomenul de răcire este reducerea ratei de fotosinteză din cauza afectării transportului electronic în tilacoizi și a fixării carbonului, reducerii conținutului de pigmenți asimilatori și a fosforului liber. Un alt efect negativ este reprezentat de modificarea fluidității membranei celulare (Nievola et al., 2017).

II.1.3. Salinitatea

Salinitatea reprezintă unul dintre cei mai importanți factori abiotici care reduc semnificativ productivitatea culturilor agricole (Mishra et al., 2021). Acumularea de săruri minerale, precum NaCl, Na₂SO₄, MgSO₄, NaHCO₃, Na₂CO₃, CaSO₄, CaCO₃ reprezintă o caracteristică majoră a solurilor salin, cu un impact negativ asupra sănătății plantelor. Expunerea îndelungată la o

concentrație ridicată de sare (NaCl) la nivelul zonei radiculare crește stresul osmotic, generând astfel toxicitate ionică. Stresul osmotic afectează absorbția apei, germinarea semințelor, alungirea celulelor, dezvoltarea frunzelor, dezvoltarea mugurilor laterali, ramificarea laterală, rata de fotosinteză, absorbția și translocarea nutrienților de la rădăcină în zonele aeriene, exercitând astfel un efect negativ asupra creșterii plantei (Mishra et al., 2021).

II.1.4. Seceta

Apa este o moleculă indispensabilă pentru creșterea și dezvoltarea culturilor agricole. Termenul de secetă implică, în general, o reducere semnificativă a conținutului de apă de la nivelul solului (Marchin et al., 2020). O creștere a zonelor predispuse la secetă a afectat în mod negativ producțiile agricole la nivel global. Se preconizează că până în anul 2050 deficitul de apă va cauza probleme majore terenurilor arabile și va afecta două treimi din populația lumii (Ahmad et al., 2022). Deshidratarea produsă de stresul hidric afectează activitățile metabolice ale plantelor, cum ar fi respirația, conținutul de clorofilă, metabolismul zaharurilor, fotosinteza și translocarea nutrienților. De asemenea, seceta reduce potențialul hidric și determină închiderea stomatelor, ceea ce afectează creșterea și alungirea celulelor (Vurukonda et al., 2016; Lata și Gond, 2019).

II.1.5. Deficitul de nutrienți

Azotul este un macronutrient care influențează în mod direct productivitatea culturilor agricole. Acesta are un rol cheie în metabolismul plantelor, fiind un element constituent al enzimelor, clorofilei, acizilor nucleici, proteinelor și peretelui celular. În consecință, o deficiență de N la plantele de cultură influențează semnificativ creșterea și dezvoltarea plantelor (Fageria și Moreira, 2011).

Fosforul este un macroelement esențial necesar creșterii și dezvoltării plantelor (Behera et al., 2014; Awais et al., 2017). Acest element este implicat în reglarea proceselor metabolice precum: diviziunea celulară, transportul de energie, biosinteza macromoleculară, fotosinteză și respirație (Sharma et al., 2013; Manzoor et al., 2017). Deficitul de fosfor la plantele de cultură influențează în mod negativ transformările metabolice, creșterea și dezvoltarea acestora (Lăcătușu, 2016).

Potasiul este al treilea cel mai important macronutrient necesar creșterii plantelor. Carența de potasiu determină formarea unui sistem radicular mai slab dezvoltat, creșterea mai lentă a plantelor, formarea unor semințe mici, ducând la scăderea calității și randamentului culturilor agricole (Yadav et al., 2017).

II.1.6. Microorganismele fitopatogene

Bolile plantelor reprezintă o amenințare gravă la adresa producției agricole. Pierderea anuală a producției agricole din cauza bolilor plantelor este estimată la peste 30% la nivel mondial și este asociată cu daune economice în valoare de sute de miliarde de dolari, având un impact puternic asupra

securității alimentare, economiilor regionale și a altor domenii socio-economice conexe. Această situație este agravată și mai mult de pierderile post–recoltă cauzate de microorganisme patogene. Mai mult decât atât, răspândirea agenților fitopatogeni este intensificată de schimbările climatice, considerate una dintre principalele amenințări la adresa culturilor la nivel mondial (Nature Climate Change, 2021; Gai și Wang, 2024).

Plantele pot fi infectate de o gamă variată de agenți patogeni (bacterii, ciuperci, virusuri și nematode) care diferă în ceea ce privește stilul de viață, strategiile de infecție și țesuturile țintă pe care le afectează (Singh et al., 2023).

II.2. INFLUENȚA STRESULUI ABIOTIC ASUPRA MICROORGANISMELOR DIN SOL

II.2.1. pH-ul

Cel mai important factor abiotic care poate afecta microbiota solului este reprezentat de pH, care la rândul lui este influențat de toxicitatea metalelor, structura și textura solului, sursa de apă și intensitatea utilizării terenurilor agricole. Atât microorganismele, cât și plantele preferă un pH cuprins între 6 și 7. Astfel, aciditatea și alcalinitatea solului determină frecvent modificări în compoziția și procesele metabolice ale comunităților microbiene (Rahman *et al.*, 2021). Se consideră că solurile acide și alcaline prezintă un număr mai redus de bacterii, comparativ cu solurile aproape neutre. Această diferență se poate explica prin faptul că pH-ul afectează solubilitatea surselor de carbon organic necesare multiplicării optime a microorganismelor, iar un pH acid determină acumularea unor concentrații ridicate de aluminiu, considerat un element toxic. În mod similar, abundența bacteriană din solurile alcaline poate scădea din cauza solubilității reduse a anumitor nutrienți, cum ar fi fosforul și fierul. Toate aceste efecte determină o scădere a numărului de microorganisme rizosferice și a proceselor lor metabolice (Zhou et al., 2024).

II.2.2. Temperatura

Încălzirea globală este un fenomen de mare amploare cu care se confruntă planeta, estimându-se că temperatura medie globală va crește cu 1,8 – 3,6 °C până în anul 2100. Acest fenomen influențează dezvoltarea plantelor și caracteristicile fenologice, precum și compoziția, densitatea, metabolismul și distribuția comunităților de microorganisme asociate sistemului radicular. Stresul cauzat de temperatură afectează activitatea microbiană deoarece este necesar un interval optim de temperatură pentru a se asigura dezvoltarea microorganismelor. S-a constatat că încălzirea globală influențează compoziția comunităților microbiene din sol, diversitatea, complexitatea și stabilitatea interacțiunilor ce se stabilesc între plante și microorganisme. De asemenea, temperaturile ridicate pot afecta circuitul nutrienților asociați cu microorganismele din sol, inclusiv ciclul carbonului, azotului, fosforului și potasiului (Zhao et al., 2024).

II.2.3. Salinitatea

Concentrațiile mari de săruri solubile influențează biomasa și activitatea microbiană, precum și structura comunităților de microorganisme din sol. Salinitatea reduce în principal biomasa microbiană deoarece stresul osmotic are ca rezultat deshidratarea și liza celulelor (Yan et al., 2015). Microorganismele care s-au adaptat la stresul osmotic pot prezenta o activitate metabolică redusă deoarece în urma sintezei de osmoliți au suferit pierderi mari de energie (Ropelewska și Zapotoczny, 2017). S-a demonstrat că unele săruri precum clorura de sodiu pot afecta activitatea microbiană a solului prin reducerea numărului total de ciuperci, actinomicete și bacterii. Efectul osmotic poate fi letal pentru microorganismele rizosferice. O scădere a biomasei microbiene și a respirației solului poate conduce la o inhibare a proceselor de descompunere și mineralizare din sol (Ropelewska și Zapotoczny, 2017).

II.2.4. Seceta

Seceta este fenomenul climatic care are cel mai mare impact asupra securității alimentare. Se consideră că severitatea și frecvența secetei va crește considerabil în următorul deceniu. Seceta manifestă un efect negativ pronunțat asupra microbiomului solului deoarece umiditatea și temperatura sunt factorii determinanți ai creșterii și activității microbiene. Nivelul de umiditate influențează microorganismele din sol și determină modificări ale metabolismului microbian și ale diversității structurale, în timp ce temperatura ridicată are un impact negativ asupra biomasei microbiene și a abundenței microorganismelor. Combinația dintre deficitul de apă și temperatura ridicată poate determina o restructurare a comunităților din sol la scară largă. Evapo-transpirația crescută cauzată de secetă poate reduce rezerva de apă din sol conducând la suprimarea activității microbiene (Rahman *et al.*, 2021).

II.3. RĂSPUNSUL BACTERIILOR TOLERANTE LA FACTORII DE STRES

II.3.1. Producerea și acumularea de osmoliți

Osmoliții sau substanțele osmoprotectoare reprezintă un grup restrâns de compuși cu greutate moleculară mică, printre care se numără: trehaloza, glicerolul, manitolul, L-prolina, L-glutamatul, L-glutamina, ectoina, 5-hidroxiectoina și glicin-betaina. Bacteriile pot acumula osmoliți fără a afecta procesele moleculare ale celulei. Această acumulare determină, de asemenea, o creștere a apei libere din celulă, care permite creșterea și diviziunea celulară în condiții hiper-osmotice. Aceste substanțe permit celulelor să crească și să se dividă în medii nefavorabile. S-a demonstrat că osmoliții protejează, de asemenea, proteinele, acizii nucleici și alte mecanisme moleculare vitale. Acumularea

de osmoliți poate fi realizată fie prin transport în celulă, fie prin biosinteză. Acești compuși sunt de asemenea utilizați în diferite căi metabolice în celulă și ca surse de carbon (Gregory și Boyd, 2021).

II.3.2. Producerea și acumularea de antioxidanți

Pentru a depăși stresul abiotic, plantele secretă enzime antioxidante. Printre cele mai importante enzime antioxidante produse de către plante se numără: catalaza (CAT), superoxid dismutaza (SOD), glutatión reductaza (GR), glutatión – S –transferaza (GST), glutatión peroxidaza (GPX), peroxidaza (POD), ascorbat peroxidaza (APX), polifenol oxidaza (PPO) și fenilalanină amoniac liaza (PAL) (Yasmeen et al., 2020).

II.3.3. Producerea de substanțe polimerice extracelulare

Substanțele polimerice extracelulare (EPS) sunt polimeri biodegradabili, cu greutate moleculară mare sintetizați de numeroase bacterii, alge și plante. EPS-urile sunt constituite dintr-un amestec complex de biomolecule care formează o matrice 3D ce conține polizaharide, zaharuri, proteine structurale, enzime, lipide, glicoproteine, ADN extracelular și unele substanțe humice (Bhagat et al., 2021). EPS-urile joacă un rol central în menținerea potențialului hidric, agregarea particulelor de sol, asigurarea contactului obligatoriu între rădăcinile plantelor și rizobacterii, precum și protejarea rădăcinilor de factorii de stres abiotic și agenții fitopatogeni (Naseem et al., 2018).

CAPITOLUL III. IMPORTANȚA BIOTEHNOLOGICĂ A BACTERIILOR CARE PROMOVEAZĂ CREȘTEREA PLANTELOR

III.1. BIOFERTILIZATORI

Utilizarea în timp a fertilizatorilor chimici a sporit productivitatea agricolă, însă a provocat apariția unor efecte negative precum poluarea mediului și dezechilibre la nivelul ecosistemelor agricole. Aplicarea repetată a îngrășămintelor chimice cauzează efecte nocive asupra mediului precum: poluarea apelor subterane și de suprafață cu fosfați și nitriți, scăderea nivelului de oxigen din ape, moartea peștilor din cauza fenomenului de eutrofizare a apelor. În plus, este afectat în mod negativ pH-ul solului ceea ce conduce la creșterea dăunătorilor și la perturbarea ecosistemelor (Rana et al., 2020). Îmbunătățirea fertilității solului este una dintre cele mai frecvente strategii utilizate pentru creșterea producției agricole. Menținerea unor niveluri ridicate de azot și fosfor disponibile, cele mai limitante două elemente nutritive din sol, reprezintă o provocare majoră pentru agricultori (Nautiyal et al., 2000; Pang et al., 2018).

Pe termen lung, sursele de fosfor utilizate în fabricarea fertilizatorilor chimici pot manifesta un efect negativ asupra microbiotei solului, determinând o reducere substanțială a respirației microbiene și a coeficientului metabolic (Sharma *et al.*, 2013). În plus, eficiența îngrășămintelor cu P aplicate depășește rar 30% datorită fixării sale sub formă de fosfat de fier / aluminiu în soluri acide sau sub formă de fosfat de calciu în soluri neutre sau alcaline. S-a sugerat faptul că fosforul total prezent în solurile agricole ar fi suficient pentru a susține recolte la randamente maxime la nivel mondial, dacă acesta ar fi disponibil plantelor (Sharma *et al.*, 2013).

Fosforul este considerat o resursă epuizabilă, iar datorită ratei de utilizare ridicate s-a estimat că rezervele de fosfat de rocă de înaltă calitate ce sunt utilizate în producerea de îngrășăminte vor fi consumate în cadrul secolului actual. Ulterior, în fabricarea de îngrășăminte pe bază de fosfor se va utiliza fosfatul de rocă de calitate inferioară, motiv pentru care costul de producție va fi mai mare. Conștientizarea acestor probleme a condus la identificarea unei strategii fezabile în vederea îmbunătățirii producției culturilor agricole în cazul solurilor unde există deficit de fosfor. Utilizarea de biofertilizatori care posedă activitate de solubilizare a fosforului în solurile agricole reprezintă o alternativă ecologică ce poate determina o creștere a randamentului culturilor (Sharma *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017).

Este cunoscut faptul că microorganismele din sol joacă un rol cheie în mobilizarea și transformarea fosforului, putând fi utilizate ca biofertilizatori pentru creșterea productivității agricole (Richardson și Simpson, 2011; Lavania și Nautiyal, 2013; Wei *et al.*, 2018). Biofertilizatorii sunt produse ce conțin microorganisme vii, care pot fi aplicate pe suprafața semințelor, răsadurilor sau direct pe sol, în vederea colonizării rizosferei, determinând într-un final stimularea creșterii plantelor. Tratarea semințelor este considerată cea mai utilizată practică de aplicare a biofertilizatorilor datorită cantității reduse de produs necesar pentru inoculare, precum și a modului simplu de lucru (Măcic *et al.*, 2020).

III.2. BIOPESTICIDE

Bolile plantelor provoacă pierderi considerabile în producția de fructe și legume atât în timpul cultivării plantelor, cât și pe parcursul manipulării, transportului și depozitării acestora. Pentru a susține randamentul culturilor agricole, acestea sunt deseori tratate cu pesticide de sinteză, care, în ciuda eficienței lor în controlul bolilor cauzate de fitopatogeni nu reprezintă o soluție durabilă din cauza costurilor ridicate și impactului pe care acestea îl au asupra sănătății umane și mediului înconjurător (Lengai și Muthomi, 2018). Se cunoaște faptul că acestea provoacă apariția cancerului și a unor afecțiuni fetale și persistă în mediu pentru o perioadă lungă de timp, fiind nedegradabile (Kumar *et al.*, 2021). Mai mult decât atât, în urma utilizării aceluiași pesticid se poate induce rezistența microorganismelor patogene la respectivul compus. Din acest motiv, studiile cercetătorilor

se îndreaptă în principal asupra dezvoltării unor tehnologii eficiente și ecologice ce presupun eliminarea sau reducerea aplicării fungicidelor de sinteză în agricultură. Una dintre alternativele promițătoare pentru atingerea acestui obiectiv se referă la utilizarea agenților microbieni în biocontrol (Morales-Cedeño et al., 2021). Agenții microbieni sau antagoniștii au rolul de a diminua efectele dăunătoare ale agenților fitopatogeni.

Suprimarea agenților fitopatogeni de către microorganisme poate fi realizată în două perioade: pre-recoltare și post-recoltare. În general, perioada de dinaintea recoltării fructelor și legumelor include activități profilactice pentru a elimina potențialii agenți patogeni. Odată ce fructele sunt recoltate, acestea trebuie transportate și depozitate, ceea ce le face în continuare susceptibile la atacul agenților patogeni. Pierderile economice în ambele perioade pot varia, uneori depășind 50% din recolta totală (Morales-Cedeño et al., 2021).

PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PERSONALE
CAPITOLUL I. SCREENING-UL UNOR TULPINI BACTERIENE CU
POTENȚIAL DE STIMULARE A CREȘTERII PLANTELOR

I.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

I.1.1. Izolarea de microorganisme solubilizatoare de fosfor

Izolarea bacteriilor care solubilizează fosforul anorganic s-a realizat din trei probe prelevate din soluri cultivate cu porumb (*Zea mays* L.):

- a. proba 1: sol cultivat cu porumb, plantele galbene la răsărit (deficiență de P)
- b. proba 2: sol cultivat cu porumb, plante normale
- c. proba 3: sol cultivat cu porumb într-o zonă sărăturată

De asemenea, o altă sursă de izolare a fost reprezentată de o probă de influent prelevată dintr-o stație orășenească de epurare a apelor uzate.

Bacteriile care prezintau în jurul coloniei un halou clar au fost considerate cu potențial de solubilizare al fosfatului tricalcic din mediul de cultură.

I.1.2. Aprecierea potențialului de solubilizare a fosfatului tricalcic

Capacitatea tulpinilor bacteriene de a solubiliza fosfatul tricalcic a fost evaluată din punct de vedere calitativ utilizând metoda de cultivare pe mediul PVK agarizat (Sarikhani et al., 2019). Astfel, inițial s-a realizat o clasificare a tulpinilor în funcție de indicele de solubilizare obținut, iar ulterior s-a efectuat o determinare cantitativă prin cultivare în bulion PVK folosind metoda fosfomolibdatului de amoniu (Artenie et al., 2008; Khadraji et al., 2017).

I.1.3. Determinarea capacității de producere a acidului indolil – 3 – acetic

Capacitatea bacteriilor de a sintetiza acid indolil – 3 – acetic (IAA) pe baza utilizării triptofanului prezent în mediul de cultură poate fi pusă în evidență folosind reactivul Salkowski. Acesta este un amestec de clorură ferică 0.5 M (FeCl_3) și acid percloric 35% (HClO_4) care în prezența de IAA formează complexul tris (indol – 3 – acetato) fier (III), de culoare roz. Intensitatea culorii roz se determină spectrofotometric la o lungime de undă de 530 nm (Gang et al., 2019).

I.1.4. Evidențierea capacității de producere a 1 – aminociclopropan – 1 – carboxilat deaminazei

Enzima 1 – aminociclopropan – 1 – carboxilat deaminaza (ACCD) este responsabilă de scăderea nivelului de etilenă din plante, considerată un „hormon al stresului”. ACCD descompune precursorul

direct al etilenei, acidul 1-aminociclopropan-1-carboxilic, în α – cetobutirat ($C_4H_6O_3$) și amoniac (NH_3), care, la rândul lor, permit plantelor să se dezvolte optim (Shahid et al., 2023).

I.1.5. Evaluarea activității antifungice a tulpinilor bacteriene

În condițiile cultivării în același mediu a tulpinilor bacteriene și fungice testate, s-a urmărit apariția unor zone de inhibiție a creșterii în jurul zonelor unde a fost depusă suspensia bacteriană datorită eliberării și difuzării în mediu a unor substanțe cu acțiune antifungică.

I.1.6. Aprecierea capacității de producere a sideroforilor

Componentele mediul O – CAS formează un complex de tipul crom azurol S – Fe^{3+} - bromură de hexadecitrimetilamoniu (HDTMA) care servește ca indicator. Atunci când un chelator puternic elimină fierul din complexul format are loc o modificare a culorii mediului în jurul coloniilor bacteriene care sunt capabile să producă siderofori (Louden et al., 2011).

I.1.7. Determinarea biomasei biofilmului prin colorare cu cristal violet

Formarea de biofilm de către bacterii poate fi pusă în evidență prin cultivarea în microplăci cu 96 de godeuri. Cuantificarea biofilmului format în godeuri se realizează în urma colorării cu o soluție de cristal violet 1%. Colorantul atașat de celulele bacteriene se solubilizează cu acid acetic 30%, intensitatea culorii fiind direct proporțională cu biomasa biofilmului (Ansari și Ahmad, 2018).

1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analizând în ansamblu rezultatele obținute în cadrul acestui capitol am constatat că atât tulpinile bacteriene izolate din soluri cultivate cu porumb, cât și cele ce provin din proba de apă uzată prezintă mai multe mecanisme de stimulare a creșterii plantelor (Tabel I.1 și Tabel I.2). În ceea ce privește izolatele din sol, tulpinile bacteriene P1S și P3.3S au prezentat toate proprietățile pentru care au fost testate. Pe de altă parte, tulpina P1.5S solubilizează fosfatul tricalcic, produce IAA, ACCD, siderofori, formează biofilm, însă nu a fost capabilă să suprimă dezvoltarea fungilor fitopatogeni utilizați. Tulpina P2.1S a determinat doar solubilizarea fosfatului tricalcic și a produs IAA, celelalte mecanisme nefiind puse în evidență prin metodele utilizate (Tabel I.1).

Tabel I.1. Mecanisme de stimulare a creșterii plantelor identificate la tulpinile bacteriene izolate din soluri cultivate cu porumb

Tulpina bacteriană	Solubilizare P	Producere IAA	Producere ACCD	Producere siderofori	Activitate antifungică	Formare biofilm
P1S	++	++	+	+	+	++
P1.1S	+++	-	-	+	-	-
P1.5S	+++	++	+	++	-	+++
P2S	+++	+	+	-	-	+++
P2.1S	+++	+++	-	-	-	-
P2.2S	+++	+++	++	-	-	+++
P3.1S	+++	+	+	-	-	+
P3.2S	++	+++	++	-	-	+++
P3.3S	+	+	++	+++	+++	+++
P3.4S	+++	+	++	-	-	+++

(+++) – potențial crescut; (++) – potențial mediu; (+) – potențial slab; (-) – potențial absent

În cazul izolatelor din apa uzată s-a observat că activitatea antifungică nu a fost evidențiată pentru nicio tulpină bacteriană, însă majoritatea tulpinilor prezintă mecanisme precum: solubilizarea fosfatului tricalcic, producerea de IAA, ACCD, siderofori și formare de biofilm (Tabel I.2).

Tabel I.2. Mecanisme de stimulare a creșterii plantelor identificate la tulpinile izolate din ape uzate

Tulpina bacteriană	Solubilizare P	Producere IAA	Producere ACCD	Producere siderofori	Activitate antifungică	Formare biofilm
D1	++	+	++	++	-	+
D2	+++	++	+	++	-	+
D3	+	+	+	+++	-	+
D4	++	++	++	-	-	+
D5	+	++	+	+	-	++
D6	+++	+	++	+	-	+++
D7	+	+	+++	-	-	+
D8	++	+	+	+	-	+++
D9	++	++	+	-	-	+++
D10	+	+	+	+++	-	+++
D11	+	+	+	-	-	++
D12	+++	+	+	-	-	+
D13	++	+	+	+++	-	++
D14	+++	+	+	-	-	++
D15	+++	+++	++	-	-	+++

Tulpina bacteriană	Solubilizare P	Producere IAA	Producere ACCD	Producere siderofori	Activitate antifungică	Formare biofilm
D16	+	+	+	-	-	+++
D17	+	+	+	+++	-	++
D18	+	+	+++	-	-	+++
D19	+++	+	+++	-	-	+
D20	++	+	+++	+	-	++
D21	+++	++	+++	-	-	+

(+++) – potențial crescut; (++) – potențial mediu; (+) – potențial slab; (-) – potențial absent

Obiectivul acestui capitol a fost reprezentat de selectarea unor tulpini care să fie utilizate ulterior pentru a investiga influența factorilor de stres asupra solubilizării fosfatului tricalcic, activității antimicrobiene și formării de biofilm. Tulpinile izolate din apa uzată nu au fost selectate pentru desfășurarea experimentelor privind solubilizarea fosforului în condiții de stres deoarece s-a observat o scădere a cantității de fosfor solubilizate atunci când tulpinile sunt testate la anumite intervale de timp. De asemenea, experimentele de determinare a P solubilizat pentru tulpinile P3.4S și P2.1S a arătat faptul că potențialul de solubilizare a fosfatului tricalcic scade semnificativ în timp. Având în vedere aceste lucruri, am selectat tulpina P1.5S pentru evaluarea efectelor stresului abiotic asupra potențialului de solubilizare al fosfatului tricalcic deoarece se numără printre cele trei tulpini izolate din soluri cultivate cu porumb care au solubilizat cele mai mari cantități de fosfor în condiții optime de cultivare, menținându-și potențialul de solubilizare relativ constant în timp. Pe de altă parte, singura tulpină care a prezentat o activitate antifungică promițătoare față de cele trei specii testate a fost P3.3S, care formează și cea mai mare cantitate de biofilm. Astfel, tulpina P3.3S a fost selectată pentru studierea activității antimicrobiene și formarea de biofilm în condiții de stres.

CAPITOLUL II. ANALIZA GENOMICĂ A TULPINILOR BACTERIENE SELECTATE

II.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

II.1.1. Izolarea ADN-ului genomic și secvențierea acestuia

Izolarea ADN-ului genomic s-a realizat urmând indicațiile producătorului kit-ului DNeasy UltraClean Microbial (Qiagen). ADN-ul genomic izolat de la cele două tulpini bacteriene selectate a fost secvențiat utilizând platforma Illumina NovaSeq 6000 (Macrogen Europe BV, Amsterdam, Olanda).

II.1.3. Asamblarea *de novo* a genomurilor bacteriene

Genomurile celor două tulpini bacteriene au fost asamblate utilizând două programe: *SPades* 3.15.4 (Bankevich et al., 2012) pentru asamblarea genomului tulpinii P3.3S, respectiv *Unicycler* 0.4.9 (Wick et al., 2017) pentru tulpina P1.5S.

II.1.4. Identificarea taxonomică a tulpinilor selectate

Datele obținute în urma asamblării genomului au fost încărcate în serverul TYGS (*Type (Strain) Genome Server*) (Meier-Kolthoff și Göker, 2019) pentru identificarea taxonomică și analiza filogenetică.

II.1.5. Adnotarea funcțională a genomurilor bacteriene

Adnotarea funcțională a celor două genomuri a fost realizată utilizând RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz et al., 2008), respectiv cu NCBI PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) (Tatusova et al., 2016).

II.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

II.2.1. Caracterizarea genomică a tulpinilor bacteriene P3.3S și P1.5S

Genomurile asamblate au fost încărcate în NCBI GenBank și sunt accesibile cu numerele JARXQM000000000 (tulpina P3.3S), respectiv JARZFW000000000 (tulpina P1.5S).

Genomul în *draft* al tulpinii P3.3S prezintă o lungime de 3 860 972 pb (perechi de baze) și 22 de *contig*-uri, fiind reprezentat de un replicon cu N50 (cea mai scurtă lungime a *contig*-urilor care constituie 50% din genom, ceea ce înseamnă că jumătate din secvența genomului este acoperită de *contig*-uri mai mari sau egale cu dimensiunea N50) de 479 779 pb și un conținut de C+G = 46,65%. Pe de altă parte, genomul în *draft* al tulpinii P1.5S are o lungime mai mică (3 667 318 pb) și doar 13 *contig*-uri. Repliconul prezintă N50 = 975,127 pb și un conținut de C+G = 41,5%. În cazul ambelor tulpini bacteriene, programele utilizate nu au indicat prezența de plasmide.

II.2.2. Încadrarea taxonomică și analiza filogenetică a tulpinilor bacteriene

Arborele filogenetic (Figura II.1) a fost format din două clade separate, cu un strămoș comun. Prima cladă a fost împărțită în două ramuri, una a cuprins doar tulpina *Bacillus nakamurai* NRRL B-41091, în timp ce a doua ramură a fost divizată la rândul ei în două subramuri: o subramură a prezentat o singură tulpină *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7, pe când cea de-a doua subramură a fost divizată în două părți: o parte a cuprins tulpinile *B. siamensis* KCTC 13613 și *B. vanillea* XY18, iar cealaltă parte a prezentat tulpina P3.3S care face parte din același cluster cu *Bacillus amyloliquefaciens* subsp.

plantarum FZB62, *Bacillus oryzicola* KACC 18228T, *Bacillus velezensis* NRRL B-41580 și *Bacillus methylotrophicus* KACC 13105.

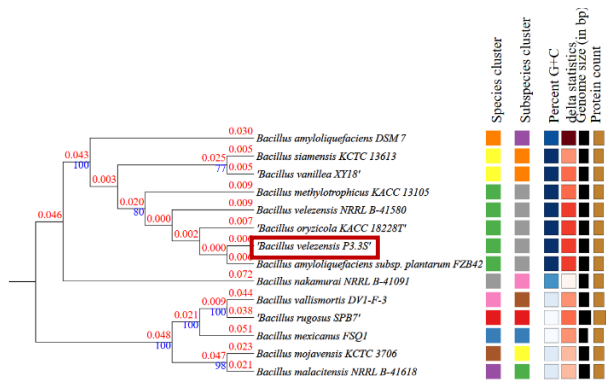


Figura II.1. Arborele filogenetic realizat pe baza întregului genom al tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S. Arborele a fost realizat cu *FastME* 2.1.6.1 care utilizează distanțele filogenetice dintre secvențele genomurilor. Lungimile ramurilor (numerele roșii) sunt scalate în funcție de formula D_s a *Genome BLAST Distance Phylogeny*. Numerele marcate cu albastru reprezintă valorile *pseudo-bootstrap* GBDP > 60% din 100 de determinări, cu un suport mediu al ramurilor de 71,5%.

Așa cum se poate observa în Figura II.1, tulpina bacteriană P3.3S prezintă o culoare identică la nivel de specie (*species cluster*) cu tulpinile *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* FZB62, *Bacillus oryzicola* KACC 18228T, *Bacillus velezensis* NRRL B-41580, și *Bacillus methylotrophicus* KACC 13105, ceea ce indică o similaritate ridicată între genomurile acestor tulpini. Această similaritate este susținută de valorile dDDH (*digital DNA-DNA hybridization*) obținute pentru tulpinile enumerate mai sus în raport cu tulpina P3.3S: 90,5%, 89,2%, 85,7%, respectiv 84,9% (Tabel II.1). Rezultatele obținute au permis identificarea tulpinii P3.3S ca aparținând speciei *Bacillus velezensis*.

Tabel II.1. Comparații dDDH între genomul tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S și genomurile tulpinilor tip selectate de TYGS. Sunt prezentate valorile dDDH, intervalele lor de încredere pentru formula d4 și diferența de conținut G+C

Tulpini bacteriene tip	dDDH (%) (d4)	LC (%) (d4)	Diferența dintre G+C (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum</i> FZB42	90,5	(88,2 - 92,3)	0,17
<i>Bacillus oryzicola</i> KACC 18228T	89,2	(86,8 - 91,2)	0,21
<i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-41580	85,7	(83,0 - 88,0)	0,33
<i>Bacillus methylotrophicus</i> KACC 13105	84,9	(82,2 - 87,3)	0,22

Tulpini bacteriene tip	dDDH (%) (d4)	LC (%) (d4)	Diferența dintre G+C (%)
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613	56,9	(54,1 - 59,6)	0,31
<i>Bacillus vanillea</i> XY18	56,8	(54,0 - 59,5)	0,33
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	55,8	(53,1 - 58,5)	0,57
<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091	30,9	(28,5 - 33,4)	1,39
<i>Bacillus malacitensis</i> NRRL B-41618	20,4	(18,1 - 22,8)	3,13
<i>Bacillus rugosus</i> SPB7	20,3	(18,1 - 22,7)	3,53
<i>Bacillus mexicanus</i> FSQ1	20,2	(18,0 - 22,6)	3,69
<i>Bacillus vallismortis</i> DV1-F-3	20,2	(18,0 - 22,6)	2,89
<i>Bacillus mojavensis</i> KCTC 3706	20,2	(18,0 - 22,6)	2,98

dddH = digital DNA-DNA hybridization calculat utilizând formula d4 (Meier-Kolthoff Göker, 2019).

IC = intervale de încredere.

În cazul tulpinii P1.5S, pe baza analizei TYGS a fost construit un arbore filogenetic împărțit în două clade cu un strămoș comun - Figura II.2. Prima cladă a fost împărțită în două ramuri. Una dintre ramuri conține tulpina P1.5S împreună cu *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* CECT 9344T, *B. safensis* FO-36b, *B. australimaris* NH7I_1 și două tulpini de *B. pumilus* (ATCC 7061 și NCTC 10337); cealaltă ramură este formată doar din *B. zhangzhouensis* MCCC 1A08372. Cea de-a doua cladă a fost la rândul ei împărțită în două ramuri. Prima ramură a fost divizată în două subramuri: prima conține speciile *B. invictae* DSM 26896 și *B. aerius* 24K, iar cea de-a doua speciile *B. cellulasensis* NCIM 5461 și *B. altitudinis* DSM 21631; ultima ramură a fost reprezentată de *B. xiamenensis* HYC-10 (Figura II.2).

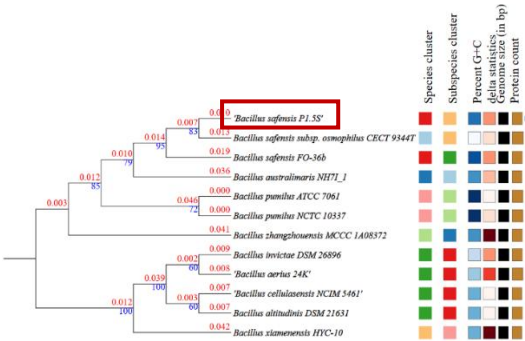


Figura II.2. Arborele filogenetic realizat pe baza întregului genom al tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S. Arborele a fost realizat cu *FastME* 2.1.6.1 care utilizează distanțele filogenetice dintre secvențele genomurilor. Lungimile ramurilor (numerele roșii) sunt scalate în funcție de formula D_s a *Genome BLAST Distance Phylogeny*.

Numerele marcate cu albastru reprezintă valorile *pseudo-bootstrap* $GBDP > 60\%$ din 100 de determinări, cu un suport mediu al ramurilor de 81,6%.

Tulpina P1.5S a fost grupată împreună cu *B. safensis* FO-36b și *B. safensis* subsp. *osmophilus* CECT 9344T într-o ramură unică. Analiza TYGS a indicat, de asemenea, o valoare a dDDH de 80,6% în comparație cu *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* CECT 9344T și de 70,7% în comparație cu *Bacillus safensis* FO-36b (Tabel II.2). Pe baza acestor rezultate, am concluzionat că tulpina P1.5S aparține speciei *Bacillus safensis*.

Tabel II.3. Comparații dDDH între genomul tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S și genomurile tulpinilor tip selectate de TYGS. Sunt prezentate valorile dDDH, intervalele lor de încredere pentru formula d4 și diferența de conținut G+C.

Tulpini bacteriene	dDDH (%) (d4)	I.C (%) (d4)	Diferența dintre G+C (%)
<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i> CECT 9344T	80,6	(77,7 - 83,2)	0,6
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b	70,7	(67,7 - 73,6)	0,11
<i>Bacillus australimaris</i> NH7I 1	52,3	(49,7 - 55,0)	0,15
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 10337	45	(42,4 - 47,6)	0,22
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	44,9	(42,4 - 47,5)	0,17
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372	42,1	(39,6 - 44,7)	0,11
<i>Bacillus xiamenensis</i> HYC-10	37,5	(35,1 - 40)	0,2
<i>Bacillus invictae</i> DSM 26896	36,6	(34,2 - 39,2)	0,39
<i>Bacillus aerius</i> 24K	36,6	(34,1 - 39,1)	0,28
<i>Bacillus altitudinis</i> DSM 21631	36,6	(34,1 - 39,1)	0,23
<i>Bacillus cellulasensis</i> NCIM 5461	36,5	(34,0 - 39,0)	0,17

dDDH = digital DNA-DNA hybridization calculat utilizând formula d4 (Meier-Kolthoff Göker, 2019).

IC = intervale de încredere.

II.2.3. Adnotarea funcțională a genomurilor tulpinilor P3.3S și P1.5S

Conform adnotării funcționale realizată de RAST s-a observat că genomul în *draft* a tulpinii *B. velezensis* P3.3S este împărțit în 321 de subsisteme, conține 3949 de secvențe codificatoare și 54 gene cu ARN. La rândul ei, tulpina *B. safensis* P1.5S prezintă 320 de subsisteme, 3831 de secvențe codificatoare și 46 de gene cu ARN. Analiza RAST a atribuit o funcție teoretică doar pentru 30% dintre genele prezente în genomul în *draft*. În cazul ambelor tulpini, analiza RAST a indicat faptul că majoritatea genelor sunt implicate în metabolismul și transportul aminoacizilor, carbohidraților și

proteinelor, producerea de cofactori, vitamine, grupări prostetice și pigmenți. De asemenea, au fost identificate gene care intervin în procesul de sporulare și dormanță (Figura II.3).

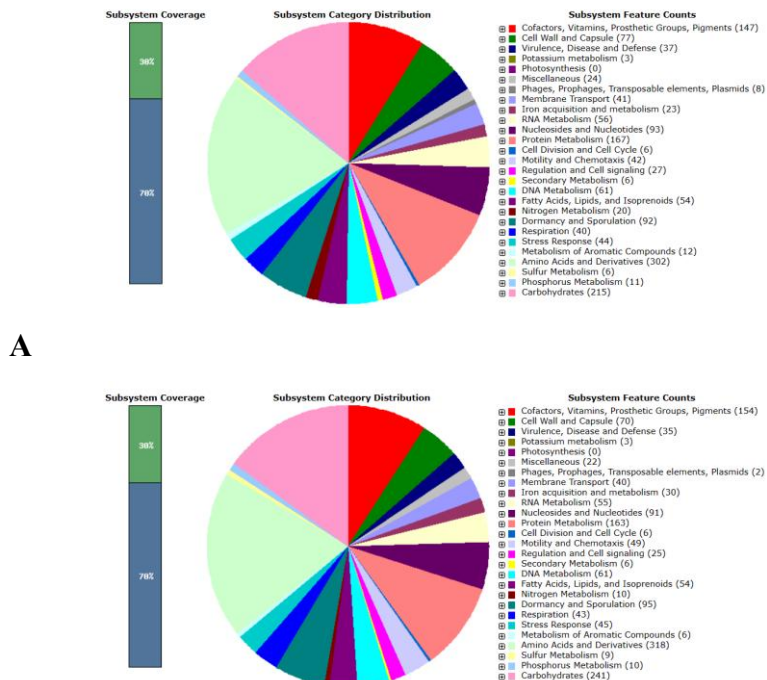


Figura II.3. Distribuția subsistemelor funcționale din genomul tulpinilor bacteriene *Bacillus velezensis* P3.3S (A) și *Bacillus safensis* P1.5S (B), conform adnotării realizate cu RAST. Culorile din grafic indică subsistemele majore, menționate în legendă. Graficul circular a fost generat și vizualizat cu *SEED Viewer*

Conform adnotării funcționale a genomului tulpinii *B. velezensis* P3.3S realizată de *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) au fost prezise în total 3826 gene, ARNt = 46, ARNnc = 5 și 5 seturi de operoni ARNr (1 set – ARN5S, 2 seturi - ARN16S, 2 seturi - ARN23S). În plus, genomul prezintă 66 de pseudogene. Pe de altă parte, genomul tulpinii *B. safensis* P1.5S conține un număr total de 3748 de gene, ARNt = 44, ARNnc = 5 și doar două seturi de operoni ARNr (16S și 23S).

CAPITOLUL III. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A TULPINILOR *BACILLUS VELEZENSIS* P3.3S ȘI *BACILLUS SAFENSIS* P1.5S

III.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

III.1.1. Identificarea grupurilor de gene responsabile de biosinteza unor metaboliți secundari cu potențială activitate antimicrobiană

Pentru a identifica existența în genomul tulpinilor selectate a genelor responsabile de sinteza unor metaboliți secundari cu potențială activitate antimicrobiană, s-a utilizat webserver-ul antiSMASH 7.0 (Blin et al., 2023). antiSMASH (*antibiotics Secondary Metabolite Analysis Shell*) permite identificarea, adnotarea și analiza rapidă a întregului genom cu privire la grupurile de gene implicate în biosinteza metaboliților secundari.

III.1.2. Identificarea lipopeptidelor extracelulare prin spectrometrie de masă

Spectrometria de masă MALDI-TOF (*Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*) este adecvată pentru identificarea unor biomolecule precum peptide, lipide, zaharide, dar și alte macromolecule organice. Spectrele de masă au fost analizate cu ajutorul software-ului *FlexAnalysis* (versiunea 4.1, Bruker), iar identificarea moleculelor cu activitate antimicrobiană s-a realizat prin compararea greutății moleculare obținute în spectrele de masă cu cele disponibile în NORINE (Flissi et al., 2019).

III.1.3. Evaluarea activității antimicrobiene prin metode difuzimetrice

Activitatea antibacteriană a fost evaluată prin măsurarea zonelor de inhibiție a creșterii tulpinii *Agrobacterium tumefaciens* GV220 în jurul godeurilor ce conțin supernatant și filtrat obținute în urma centrifugării culturilor bacteriene de interes (P3.3S și P1.5S). Pentru a stabili activitatea antifungică s-a calculat procentajul de inhibiție al miceliilor fungice (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*). Pentru a evalua influența pH-ului, salinității și secetei asupra activității antimicrobiene a tulpinii *B. velezensis* P3.3S, aceasta s-a cultivat în mediul YEB cu: pH 5, 6, 8, 9; concentrații de NaCl: 2,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 și 40 g/L; concentrații de PEG₈₀₀₀: 8, 12, 15, 17,7 și 20%; controlul a fost reprezentat de mediul YEB cu pH 7, fără NaCl și PEG₈₀₀₀.

III.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

III.2.1. Genomul tulpinilor *Bacillus safensis* P1.5S și *Bacillus velezensis* P3.3S conține gene implicate în biosinteza de metaboliți secundari cu activitate antimicrobiană

Analiza antiSMASH a permis identificarea în genomul tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S a 11 grupuri de gene implicate în producerea de metaboliți secundari. Dintre cele 11 grupuri identificate, 5 sunt prezente în nodul 1, în timp ce în nodurile 2, 4, 5, 6, 11 și 12 s-au observat câte un singur cluster. Dintre acestea, doar șapte au prezentat o similaritate semnificativă cu grupurile identificate anterior în MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*) - Figura III.1. Pentru 6 grupuri s-a obținut un procentaj de similaritate de 100% cu baza de date, acestea fiind puse în legătură cu biosinteza de bacilaenă (regiunea 1.1), fengicină (regiunea 1.2), difucidină (regiunea 1.5), bacilizină (regiunea 2.1), macrolactină H (regiunea 6.1) și bacilibactină (12.1). O altă moleculă identificată a fost surfactina (regiunea 4.1), cu un procentaj de 95%. Grupurile 1.3, 1.4, 6.1, 11.1 nu au putut fi identificate deoarece nu prezintă similaritate cu niciun compus disponibil în baza de date (Figura III.1).

Într-o primă etapă, analiza automată antiSMASH nu a permis identificarea în genomul tulpinii *B. velezensis* P3.3S a grupului de gene biosintetice responsabil de producerea iturinei. Acest lucru este destul de neobișnuit deoarece grupul de gene responsabil de producerea de iturine este de obicei identificat în genomurile unor specii precum *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* și *B. velezensis*. Prin urmare s-a procedat la verificarea manuală a rezultatelor generate, remarcându-se că grupul de gene biosintetice (regiunea 1.2) ce intervin în producerea de fengicină conține de fapt două grupuri de gene adiacente: un grup responsabil de biosinteza de fengicină sau plipastatină, respectiv un grup ce conține gene relaționate cu sinteza unor compuși din clasa iturinelor (bacilomicină D, micosubtilină, paenilarvin sau alte substanțe asemănătoare iturinei). De menționat este faptul că procentajul de similaritate cu baza de date a fost de 100% pentru genele ce intervin în biosinteza de fengicină, plipastatină, bacilomicină, micosubtilină și parnilarvin, respectiv 88% pentru cele implicate în producerea de iturină (Figura III.1).

O situație similară a fost întâlnită și în cazul regiunii 12.1. La o primă analiză, grupul de gene din această regiune este atribuit producerii de bacilibactină, însă la o analiză mai detaliată s-a observat că și această regiune este formată de fapt din două grupuri de gene: unul implicat în producerea de bacilibactină sau paenibactină, respectiv un cluster responsabil cu sinteza de amilociclină. Și în acest caz, procentajul de similaritate a fost de 100%.

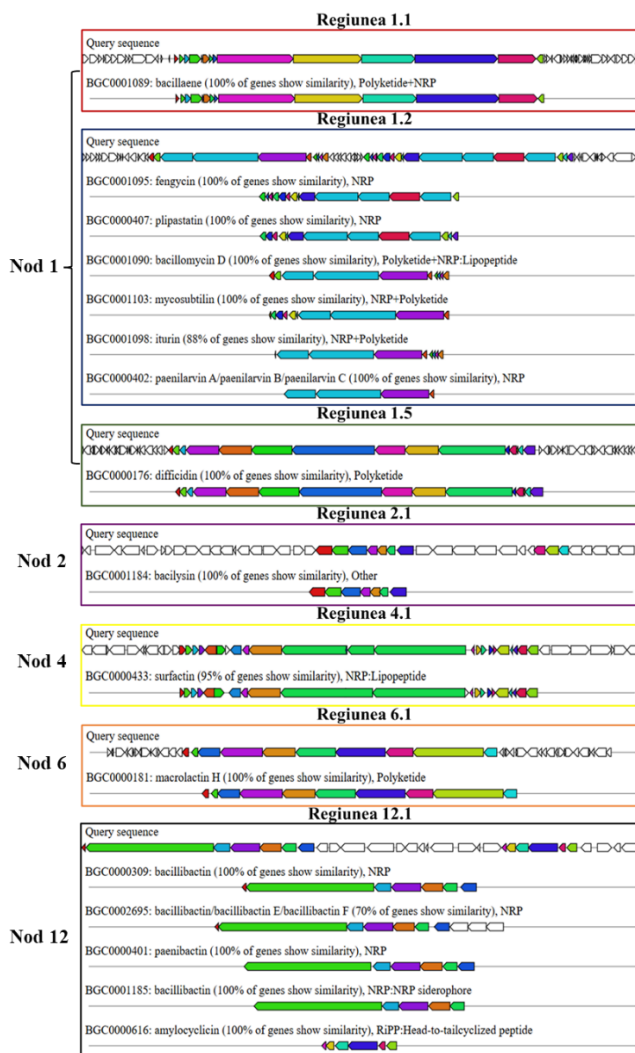


Figura III.1. Grupurile de gene biosintetice implicate în producerea de metaboliți secundari cu activitate antimicrobiană identificate în genomul tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S cu ajutorul webserver-ului antiSMASH. Regiunile 1.1, 1.2, 1.5 au fost identificate în nodul 1, regiunea 2.1 în nodul 2, regiunea 4.1 în nodul 4, regiunea 6.1 în nodul 6 și regiunea 12.1 în nodul 12. În fiecare chenar aferent regiunilor menționate sunt prezentate grupurile de gene biosintetice identificate în genomul tulpinii *B. velezensis* P3.3S (query sequence), respectiv metaboliți secundari din Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster care au prezentat similaritate cu secvența căutată

În ceea ce privește tulpina *Bacillus safensis* P1.5S, analiza antiSMASH a permis identificarea a 12 grupuri de gene implicate în biosinteza de metaboliti secundari (Figura III.2). Dintre grupurile identificate, 4 sunt prezente în nodul 1, 2 în nodul 2, 2 în nodul 3, 2 în nodul 5, respectiv câte unul în nodurile 6 și 10. Patru grupuri nu prezintă similaritate cu baza de date. Spre deosebire de grupurile identificate anterior în cazul tulpinii P3.3S, acestea au prezentat procente reduse de similaritate cu baza de date, fiind legate de sinteza de fengicină (53%, regiunea 1.1), botromycină A2 (6%, regiunea 1.4), bacilizină (85%, regiunea 2.1), bacilbactină (80%, regiunea 2.2), schizokinen (60%, regiunea 3.1) și surfactină (39%, regiunea 6.1). Două dintre grupurile de gene identificate au fost asociate cu producerea de lichenizină (50% - regiunea 5.2, respectiv 14% - regiunea 10.1) - Figura III.2.

Așa cum s-a observat și în cazul genomului tulpinii *B. velezensis* P3.3S, grupul de gene implicate în producerea sideroforului bacilbactină identificat în genomul tulpinii *B. safensis* P1.5 este responsabil și de sinteza de paenibactină, cu un procentaj de similaritate de 100% (Figura III.2).

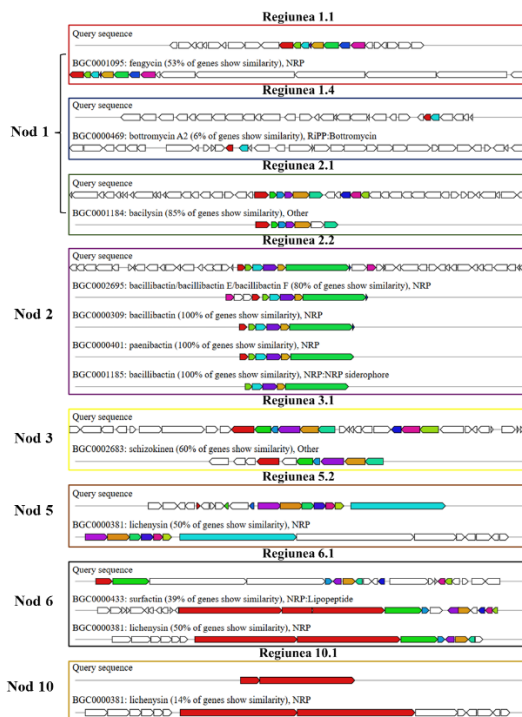
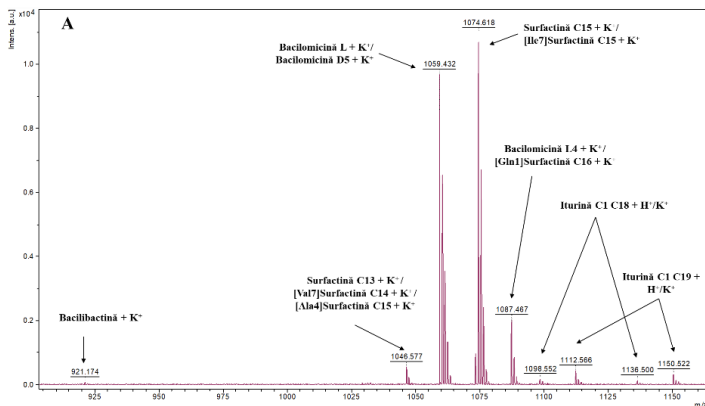


Figura III.2. Grupurile de gene biosintetice implicate în producerea de metaboliti secundari cu activitate antimicrobiană identificate în genomul tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S cu ajutorul webserver-ului

antiSMASH. Regiunile 1.1, 1.4 au fost identificate în nodul 1, regiunile 2.1, 2.2 în nodul 2, regiunea 3.1 în nodul 3, regiunea 5.2 în nodul 5, regiunea 6.1 în nodul 6 și regiunea 10.1 în nodul 10. În fiecare chenar aferent regiunilor menționate sunt prezentate grupurile de gene biosintetice identificate în genomul tulpinii *B. safensis* P1.5S (*query sequence*), respectiv metaboliții secundari din *Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster* care au prezentat similaritate cu secvența căutată

III.3.2. Tulpinile bacteriene selectate produc lipopeptide antimicrobiene

Analiza MALDI-TOF a supernatantului culturii tulpinii *B. velezensis* P3.3S a indicat prezența unor molecule cu greutate moleculară diferită ce aparțin celor trei clase de lipopeptide: surfactină, iturină și fengicină (Figura III.3). Astfel, metaboliții secundari care fac parte din clasa surfactinelor au fost identificați la 1043 Da (surfactină C13+K⁺/[Val7]surfactină C14+K⁺/[Ala4]surfactină C15+K⁺, surfactină C15+K⁺), 1074 Da (surfactină C15+K⁺/[Ile7]surfactină C15+K⁺) (Figura III.3.A). Din clasa iturinelor, tulpina P3.3S produce bacilomicină L+K⁺/bacilomicină D5+K⁺ (1059 Da), respectiv iturină C1 cu greutatea moleculară cuprinsă între 1098 Da (iturină C1 C18+K⁺/H⁺) și 1150 Da (iturină C1 C19+K⁺/H⁺) (Figura III.3.A). Compuși cu greutate moleculară de 1087 Da au fost identificați fie ca [Gln1] surfactină C16+K⁺, fie ca bacilomicină L4+K⁺. Cele mai multe spectre au corespuns cu biomoleculele din clasa fengicinelor. Greutatea moleculară a acestora a variat între 1463 și 1543 Da. Printre compușii produși de tulpina P3.3S se numără fengicina A C14 – C17+K⁺/H⁺ și fengicina B C15 – C17+K⁺/H⁺ (Figura III.3.B). Pe lângă cele trei clase de lipopeptide, analiza MALDI-TOF a evidențiat și prezența bacilabactinei+K⁺ (921 Da) - Figura III.3.A.



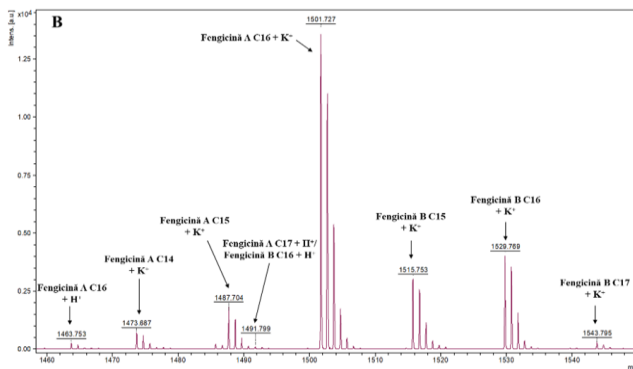


Figura III.3. Molecule cu activitate antimicrobiană identificate în supernatantul culturii *Bacillus velezensis* P3.3S prin spectrometrie de masă MALDI-TOF după 72 h de cultivare în mediul Landy. A – spectrele corespunzătoare producerii de bacilibactină, bacilomicină, iturină și surfactină; B – spectrele corespunzătoare producerii de fengicină.

În urma analizei spectrelor obținute prin MALDI-TOF s-a observat faptul că tulpina *B. safensis* P1.5S sintetizează mai puține molecule cu activitate antimicrobiană decât tulpina *B. velezensis* P3.3S. S-a remarcat prezența unei singure clase de lipopeptide și a sideroforului bacilibactină+K⁺ (921 Da). S-au identificat trei greutăți moleculare care au corespuns cu diferiți izomeri ai surfactinei: 1060 – surfactină C14+K⁺/ [Val7] surfactină C15+K⁺/ [Ile7] surfactină C14+K⁺; 1074 – surfactină C15+K⁺/ [Ile7] surfactină C15+K⁺; 1088 – surfactină C16+K⁺/ [Val7] surfactină C17+K⁺ (Figura III.4).

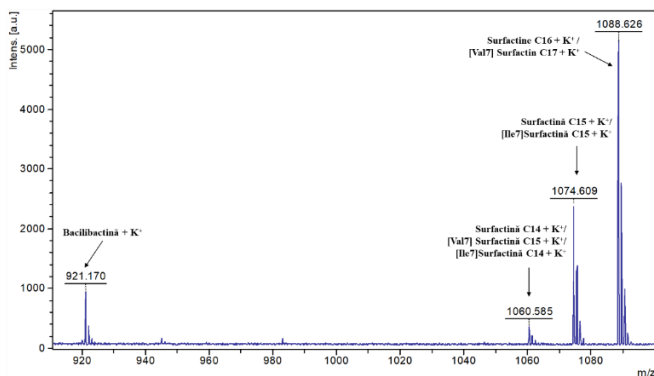


Figura III.4. Moleculele cu activitate antimicrobiană identificate în supernatantul culturii *Bacillus safensis* P1.5S prin spectrometrie de masă MALDI-TOF după 72 h de cultivare în mediul Landy.

III.2.3. Tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S prezintă activitate antimicrobiană față de microorganismele fitopatogene testate

Analiza MALDI-TOF a evidențiat producerea de molecule despre care se cunoaște că prezintă activitate antimicrobiană, motiv pentru care ne-am propus efectuarea de teste pentru a confirma potențialul antimicrobian al tulpinilor *Bacillus velezensis* P3.3S și *Bacillus safensis* P1.5S față de cinci agenți fitopatogeni: tulpina bacteriană *Agrobacterium tumefaciens* GV220, respectiv fungii *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Verticillium dahliae*.

III.3.3.1. Activitatea antibacteriană

Rezultatele obținute în urma efectuării testului de antagonism direct a evidențiat faptul că tulpina *B. velezensis* P3.3S prezintă activitate antibacteriană față de bacteria fitopatogenă testată. De remarcant este faptul că filtratul culturii a determinat inhibarea creșterii tulpinii *A. tumefaciens* GV220, ceea ce demonstrează producerea și eliberarea unor molecule cu activitate antibacteriană în mediul de cultură (Figura III.5). Pe de altă parte, *B. safensis* P1.5S nu a determinat apariția unor zone de inhibiție a creșterii tulpinii *A. tumefaciens* GV220 (Figura III.5).

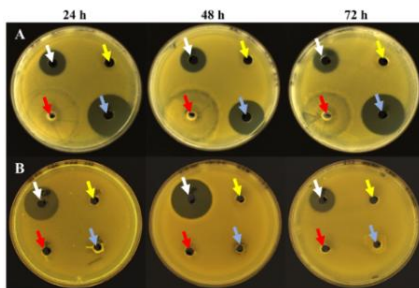


Figura III.5. Activitatea antibacteriană a tulpinilor *Bacillus velezensis* P3.3S (A) și *Bacillus safensis* P1.5S (B) față de *Agrobacterium tumefaciens* GV220. În godeurile din plăci s-a adăugat: kanamicină 100 µg/mL – săgețile albe; mediu YEB steril – săgețile galbene; supernatant – săgețile roșii; filtrat – săgețile albastre.

În ceea ce privește activitatea antibacteriană a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S, diametrele zonelor de inhibiție a creșterii tulpinii *A. tumefaciens* GV220 au variat în funcție de timpul de incubare a culturii bacteriene testate, dar și de proba utilizată (supernatant sau filtrat). Astfel, în cazul supernatantului obținut în urma centrifugării culturii *B. velezensis* P3.3S s-au înregistrat zone de inhibiție ce variază între 34 și 37 mm. Referitor la filtratul culturii, s-a observat o inhibare mai redusă a creșterii bacteriei fitopatogene, diametrul fiind cuprins între 22 și 27,5 mm, valoarea maximă fiind măsurată la 24 h de incubare a culturii bacteriene P3.3S. De menționat este faptul că filtratul culturii *B. velezensis* P3.3S a fost mai eficient în inhibarea creșterii tulpinii de *A. tumefaciens* testată, în comparație cu kanamicina (100 µg/mL) la 24, 48 și 72h (Tabel III.1).

Tabel III.1. Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii tulpinii *Agrobacterium tumefaciens* GV220 în prezența tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S. Valorile reprezintă media a două determinări $\pm$ eroarea standard a mediei

Variante testate	Diametrul zonei de inhibiție (mm)		
	24 h	48 h	72 h
Kanamicină (100 $\mu\text{g/mL}$)	16 $\pm$ 0	16 $\pm$ 1	15,5 $\pm$ 0,5
Supernatant	35 $\pm$ 0	37 $\pm$ 2	34 $\pm$ 4
Filtrat	27,5 $\pm$ 0,5	22 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2

III.3.3.2. Activitatea antifungică

În urma efectuării testului de antagonism direct s-a constatat că tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S prezintă activitate antifungică față de toate cele patru specii fitopatogene testate: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* și *Verticillium dahliae* (Figura III.6). De remarcat este faptul că în cazul speciilor *Sclerotinia sclerotiorum* și *Fusarium oxysporum* nu există un contact direct între miceliul fungilor și tulpina bacteriană, fapt ce sugerează secreția și difuzarea în mediu a unor substanțe cu activitate antifungică precum surfactina, iturina, bacilomicina, fengicina și bacilibactină, lucru confirmat prin spectrometria de masă.

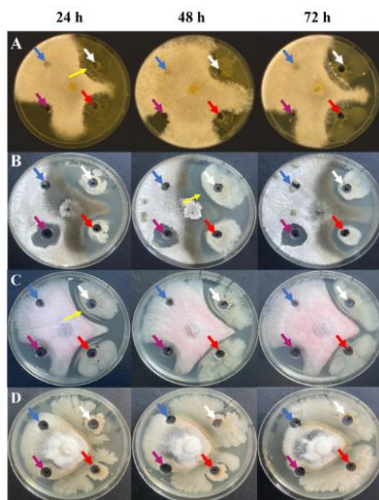


Figura III.6. Activitatea antifungică a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S față de *Rhizoctonia solani* (A), *Sclerotinia sclerotiorum* (B), *Fusarium oxysporum* (C) și *Verticillium dahliae* (D). În godeurile realizate în placă s-au adăugat: mediu YEB steril (control negativ) – săgețile albastre; cultură bacteriană – săgețile albe; supernatant – săgețile violet; filtrat – săgețile roșii. Săgețile galbene indică zonele de inhibiție a creșterii miceliului fungic.

Tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S a inhibat dezvoltarea miceliului celor patru specii fitopatogene utilizate, cele mai mari procentaje de inhibiție fiind înregistrate în cazul culturii bacteriene, urmată de supernatant, respectiv filtrat. Astfel, pentru cultura de *B. velezensis* P3.3S s-au înregistrat procentaje de inhibiție cuprinse între 58,03% (*V. dahliae* 72 h) și 707% (*Rhizoctonia solani* 24 h) - Figura III.7. Referitor la supernatant, cea mai bună activitate s-a observat față de specia *Sclerotinia sclerotiorum* la 48 h, cu un procentaj de inhibiție de 65% (Figura III.7-B). Totodată, filtratul culturii bacteriene a prezentat o activitate importantă față de trei dintre speciile fungice testate, dezvoltarea miceliului de *S. sclerotiorum* fiind cea mai afectată, procentajul de inhibiție variind între 57,27 și 61,45% (Figura III.7-B). Pe de altă parte, cea mai scăzută activitate s-a remarcat în cazul speciei *Verticillium dahliae*, procentajul de inhibiție înregistrat fiind de 5,95-10,35% (Figura III.7-D). Această diferență de activitate antifungică poate fi pusă în legătură cu timpul îndelungat de incubare a speciei *V. dahliae* împreună cu filtratul (20 zile), timp în care este posibil ca metaboliții secundari prezenți în filtratul bacterian să își piardă din stabilitate și implicit din activitate.

În cazul tuturor speciilor fungice testate, cu excepția *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura III.7-B), s-au evidențiat diferențe semnificative între activitatea antifungică a celor trei tipuri de probe analizate: cultură bacteriană, supernatant și filtrat. Pentru speciile *Fusarium oxysporum* și *Verticillium dahliae*, procentajul de inhibiție asociat filtratului a fost semnificativ mai scăzut comparativ cu valorile obținute pentru cultura bacteriană și supernatant, la toate intervalele de timp investigate (Figura III.7-C, D). În cazul *Rhizoctonia solani*, activitatea antifungică a filtratului a scăzut considerabil la 24 h (55,05%) și 48 h (50%), comparativ cu cea a culturii bacteriene, iar la 72 h, eficiența filtratului (39,66%) a fost redusă și în raport cu supernatantul.

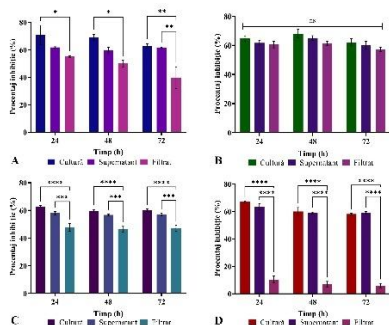


Figura III.7. Procentajele de inhibiție ale dezvoltării miceliilor de *Rhizoctonia solani* (A), *Sclerotinia sclerotiorum* (B), *Fusarium oxysporum* (C) și *Verticillium dahliae* (D) înregistrate în cazul tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$); ns –lipsa diferențelor semnificative.

În urma evaluării activității antifungice a tulpinii *B. safensis* P1.5S față de cele patru specii fitopatogene utilizate (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* și *Verticillium dahliae*) s-a constatat că această tulpină inhibă doar dezvoltarea miceliului de *Rhizoctonia solani* la 24 h, cu un procentaj de 50,58%. În cazul celorlalte specii testate miceliul fungic s-a dezvoltat pe întreaga suprafață a mediului PDA, indiferent de timpul de incubare sau varianta testate (Figura III.8).

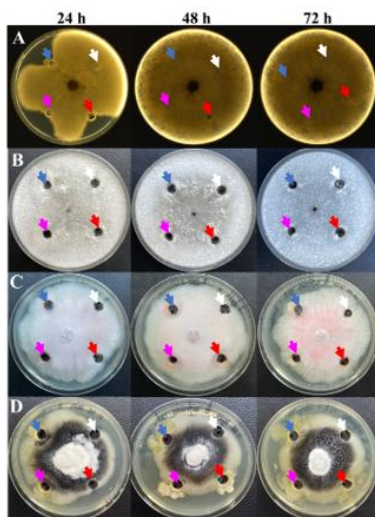


Figura III.8. Rezultatele testelor de antagonism direct dintre *Bacillus safensis* P1.5S și *Rhizoctonia solani* (A), *Sclerotinia sclerotiorum* (B), *Fusarium oxysporum* (C) și *Verticillium dahliae* (D). În godeurile realizate în placă s-au adăugat: mediu YEB steril (control negativ) – săgețile albastre; cultură bacteriană – săgețile albe; supernatant – săgețile violet; filtrat – săgețile roșii.

III.3.4. Influența factorilor de stres abiotic asupra activității antimicrobiene a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S

Activitatea antimicrobiană a tulpinii *B. velezensis* P3.3S a fost evaluată în condiții de stres abiotic (pH, salinitate – NaCl, și secetă – PEG₈₀₀₀). Ca microorganisme test au fost folosite *A. tumefaciens* GV220 și *S. sclerotiorum*, pentru care s-au înregistrat cele mai bune rezultate privind inhibarea creșterii. Determinările au fost realizate după 24 h de cultivare a tulpinii *B. velezensis* P3.3S în mediul YEB care a fost modificat pentru a simula condițiile de stres abiotic precizate anterior. Drept probe s-a utilizat filtratul fiecărei culturi bacteriene.

Efectul clorurii de sodiu asupra activității antibacteriene a tulpinii *B. velezensis* P3.3S variază în funcție de concentrația utilizată. Astfel, s-a observat că suplimentarea mediului YEB cu 2,5, 10, 15 și 20 g/L NaCl a stimulat inhibarea creșterii speciei *A. tumefaciens* GV220, diametrele zonelor de

inhibiție măsurată fiind cuprinsă între 23,18 și 27,5 mm, spre deosebire de control (mediu YEB fără NaCl) unde diametrul a fost de 21,66 mm (Figura III.9-A). Pe de altă parte, s-a constatat că la concentrații mai mari de NaCl (25, 30 și 35 g/L), activitatea antibacteriană a tulpinii P3.3S față de *A. tumefaciens* GV220 a fost influențată negativ, diametrul zonei de inhibiție scăzând concomitent cu creșterea concentrației de NaCl, până la o valoare de 40 g/l NaCl când nu se mai observă o inhibare a creșterii (Figura III.9-A).

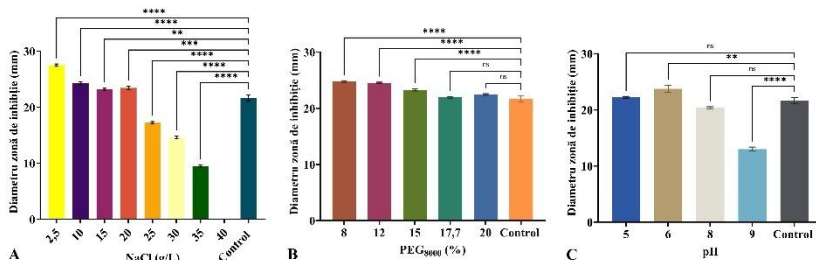


Figura III.9. Influența concentrațiilor de NaCl (A), PEG₈₀₀₀ (B) și pH-ului mediului (C) asupra activității antibacteriene a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S împotriva *Agrobacterium tumefaciens* GV220. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (** = $p < 01$, *** = $p < 001$; **** = $p < 0001$); ns – nu există diferențe semnificative.

Concentrațiile de PEG₈₀₀₀ utilizate pentru a simula stresul hidric nu au influențat activitatea antibacteriană a tulpinii *B. velezensis* P3.3S împotriva tulpinii *A. tumefaciens* GV220. Filtratul culturilor bacteriene a determinat apariția unor zone de inhibiție cuprinse între 21,93 și 24,75 mm, comparativ cu varianta control unde diametrul a fost de 21,66 mm. În plus, filtratul obținut în urma cultivării tulpinii de interes în mediu YEB ce conține concentrații de 8, 12 și 15% PEG₈₀₀₀ a prezentat o activitate semnificativ mai pronunțată față de control ($p < 05$), ceea ce indică o stimulare a producerii de metaboliți secundari cu activitate antibacteriană.

Activitatea antibacteriană a tulpinii *B. velezensis* P3.3S față de *A. tumefaciens* GV220 a variat și în funcție de pH-ul inițial al mediului YEB utilizat pentru cultivare. Astfel, activitatea maximă înregistrată s-a observat la pH 6, cu un diametru al zonei de inhibiție de 23,75 mm, semnificativ statistic față de control (21,66 mm), dar și față de celelalte valori de pH testate. Eficiența inhibării creșterii *A. tumefaciens* GV220 scade odată cu creșterea pH-ului inițial al mediului, cele mai mici zone de inhibiție (13 mm) fiind înregistrate în urma cultivării tulpinii de interes în mediu YEB cu un pH inițial puternic alcalin (9) - Figura III.9-C.

Activitatea antifungică a tulpinii *B. velezensis* P3.3S față de specia fitopatogenă *Sclerotinia sclerotiorum* a variat în funcție de condițiile testate. Astfel, filtratele bacteriene obținute ca urmare a cultivării tulpinii de interes în mediu YEB suplimentat cu 2,5, 10 și 15 g/L NaCl au

prezentat o activitate antifungică mai pronunțată, procentajele de inhibiție variind între 48,90 și 52,56%. Aceste valori nu sunt însă semnificative față de controlul reprezentat de filtratul tulpinii *B. velezensis* P3.3S cultivat în mediu YEB lipsit de NaCl (46,50%) - Figura III.10-A. Pornind de la concentrația de 20 g/L NaCl, activitatea antifungică a filtratului scade pe măsură ce conținutul de NaCl din mediu crește, de la un procentaj de inhibiție de 36,96% la 25,26% (înregistrat la o valoare de 35 g/L NaCl). Ca și în cazul activității antibacteriene, concentrația de 40 g/L nu a determinat inhibarea miceliului de *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura III.10-A).

Rezultatele obținute cu privire la efectul concentrațiilor de PEG₈₀₀₀ asupra activității antifungice a tulpinii bacteriene au arătat că procentajele de inhibiție ale miceliului speciei *Sclerotinia sclerotiorum* au variat între 51,28 și 54,88%, comparativ cu varianta control (46,82%) reprezentată de filtratul obținut ca urmare a cultivării tulpinii de interes în mediu YEB fără PEG₈₀₀₀ (Figura III.10-B). Activitatea antifungică a tulpinii *B. velezensis* P3.3S a fost semnificativ mai pronunțată în cazul filtratului obținut după cultivarea acesteia în mediu YEB suplimentat cu 8% și respectiv 12% PEG₈₀₀₀, comparativ cu controlul.

Activitatea antifungică a tulpinii *B. velezensis* P3.3S s-a păstrat și în cazul cultivării acesteia în mediu YEB cu diferite valori de pH, excepția fiind reprezentată de pH-ul puternic alcalin (9) care nu a determinat inhibarea dezvoltării miceliului speciei fungice utilizate. Așadar, filtratele rezultate în urma cultivării tulpinii bacteriene în mediu YEB cu pH 5, 6 și 8 au inhibat dezvoltarea *S. sclerotiorum*, procentajul de inhibiție maxim fiind înregistrat la pH 6 (54,09%) (Figura III.10-C). Analiza statistică realizată nu a indicat diferențe semnificative între zonele de inhibiție obținute la pH 5, 6, respectiv 8 și control, reprezentat de filtratul tulpinii *B. velezensis* P3.3S cultivată în mediul YEB cu pH inițial neutru (7).

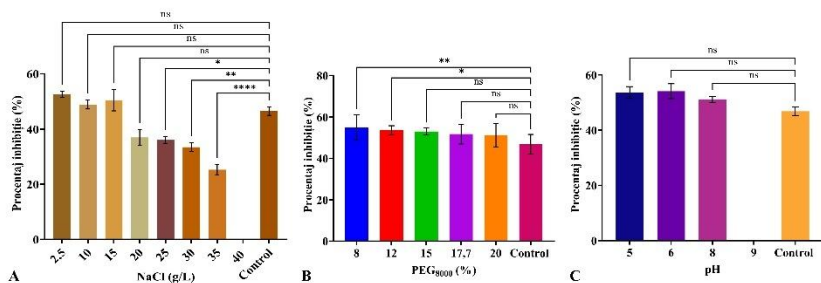


Figura III.10. Influența concentrațiilor de NaCl (A), PEG₈₀₀₀ (B) și pH-ului mediului (C) asupra activității antifungice a tulpinii *B. velezensis* P3.3S împotriva *Sclerotinia sclerotiorum*. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$; ns – nu există diferențe semnificative).

CAPITOLUL IV. EFECTUL FACTORILOR DE STRES ABIOTIC ASUPRA MECANISMELOR IMPLICATE ÎN COLONIZAREA RĂDĂCINILOR LA BACILLUS VELEZENSIS P3.3S

IV.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Mecanismele implicate în colonizarea rădăcinilor (motilitate, formare de biofilm) au fost evaluate în condiții de stres abiotic reprezentat de pH (5, 6, 7, 8, 9), salinitate (2,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 g/L NaCl) și secetă (8, 12, 15, 17,7, 20% PEG₈₀₀₀).

IV.1.1. Identificarea genelor implicate în colonizarea rădăcinilor

Algoritmul BLAST a fost utilizat pentru a identifica gene de interes în genomul tulpinii *B. velezensis* P3.3S. Genele cu o identitate mai mare de 30% și un procentaj de acoperire de peste 70% au fost considerate *hit-uri* pozitive.

IV.1.2. Evaluarea proprietăților chemotactice

Punerea în evidență a capacității bacteriilor de a se îndrepta către anumiți compuși s-a realizat *in vitro* prin utilizarea unui sistem chemotactic format din 3 elemente: agentul chemotactic (acizi organici și glucide), vârf steril de pipetă de 200 μl (utilizat drept cameră), un ac și o seringă de 1 mL (Sharma et al., 2020).

IV.1.3. Evidențierea motilității celulelor bacteriene

Motilitatea de tip *swimming* și *swarming* a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S, în prezența factori de stres investigați, a fost evaluată macroscopic prin aprecierea suprafeței colonizate pe medii semisolide.

IV.1.4. Cuantificarea biofilmului microbial prin colorare cu cristal violet

Cuantificarea biofilmului format s-a realizat prin colorare cu o soluție de cristal violet 1%. Ulterior, colorantul legat s-a solubilizat cu acid acetic 30%, intensitatea culorii determinată spectrofotometric fiind direct proporțională cu numărul de celulele din biofilm (Ansari și Ahmad, 2018).

IV.1.5. Analiza biofilmelor folosind microscopia electronică cu baleiaj

Microscopia electronică cu baleiaj (SEM) permite analizarea suprafeței biofilmelor produse de către bacterii și poate pune în evidență prezența substanțelor polimerice extracelulare secretate de către celule.

IV.1.6. Vizualizarea biofilmului utilizând microscopia confocală cu scanare laser

Pentru a evidenția influența factorilor abiotici (pH, salinitate și secetă) asupra formării de biofilm de către tulpina *B. velezensis* P3.3S s-au realizat fotografii în câmpuri microscopice diferite cu scopul vizualizării arhitecturii biofilmului și grosimii acestuia.

IV.2.7. Aprecierea hidrofobității suprafeței celulare prin aderarea la hidrocarburi

Pentru a stabili procentajul de hidrofobicitate s-a utilizat următoarea formulă (Ansari și Ahmad, 2019):

$$\text{Procentaj de hidrofobicitate} = \frac{\text{OD400 inițial} - \text{OD400 final}}{\text{OD400 inițial}} \times 100$$

IV.2.8. Determinarea conținutului total de carbohidrați

În vederea determinării conținutului total de carbohidrați s-a utilizat metoda cu fenol și acid sulfuric prezentată de (Nielsen, 2017). Compușii rezultați în urma acțiunii acidului sulfuric condensează cu fenol pentru a forma compuși stabili de culoare galben-aurie, care pot fi determinați spectrofotometric (Nielsen, 2017).

IV.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

IV.2.1. Genomul tulpinii *B. velezensis* P3.3S conține gene responsabile de mecanisme implicate în colonizare

Tulpina *B. velezensis* P3.3S prezintă 19 gene implicate în chemotaxie și motilitate, pentru care s-a obținut un procent de identitate ce variază între 49,10 și 94,17%. Printre acestea se numără: *cheA*, *cheB*, *cheC*, *cheR*, *cheV*, *cheY*, *cheW*, *tlpAB*, *mcpABC*, *motAB*, *swrABCD*.

De asemenea, genomul tulpinii *B. velezensis* P3.3S, au fost identificate în genom patru gene implicate în sistemul de semnalizare *quorum sensing*: *luxS*, *comA*, *comP*, *comQ*.

Mai mult, analiza BLAST a identificat mai multe gene implicate în formarea de biofilm (*spo0A*, *tapA*, *sipW*, *tasA*, *sinR*, *sinI*, *ylbF*, *ymcA*, *yuaB*), producerea de substanțe polimerice extracelulare (*epsC-O*), γ -poliglutamic (*pgsA-C*), surfactină (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*), dar și gene care reglează acest procese.

IV.2.2. Tulpina *B. velezensis* P3.3S prezintă proprietăți chemotactice

Testul de chemotaxie capilară realizat a evidențiat faptul că tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S a fost atrasă de toți compușii testați, însă răspunsul chemotactic relativ (RCR) a variat în funcție de fiecare substanță utilizată. Astfel, RCR a fost maxim în urma expunerii celulelor bacteriene la glucoză

(30,66), urmată de acid fumaric (28,33), acid citric (27,66), maltoză (26,33), acid malic (25,66), fructoză (21,33) și acid succinic (3,66) – Figura IV.1.

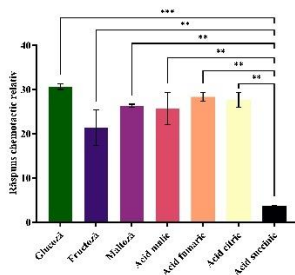


Figura IV.1. Răspunsul chemotactic relativ al tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S în urma expunerii celulelor bacteriene la diferiți compuși organici. Răspunsul chemotactic relativ reprezintă raportul dintre unitățile formatoare de colonii dezvoltate în urma expunerii la chemoatractant față de cel al controlului (apă distilată sterilă). Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)

IV.2.3. Motilitatea tulpinii *B. velezensis* P3.3S în condiții de stres

În urma cultivării pe mediul NB semisolid s-a observat că tulpina *B. velezensis* P3.3S prezintă atât motilitate de tip *swimming* cât și de tip *swarming*. Mai mult decât atât, tulpina este capabilă să se deplaseze pe întreaga suprafață a mediului indiferent de tipul factorului de stres testat. Singurele diferențe care au putut fi vizualizate atât în cazul motilității de tip *swimming*, cât și a celei de tip *swarming* se referă la aspectul microscopic al coloniei formate la suprafața mediului.

În cazul motilității de tip *swimming* s-a observat o deplasare uniformă a celulelor bacteriene ca urmare a cultivării pe mediu cu pH 7 și 9. La pH 5 și pH 6 s-a remarcat un aspect neuniform al suprafeței colonizate, în timp ce la pH 8 s-a putut observa prezența unor linii care se întrepătrund și formează ramuri (Figura IV.2-A). În ceea ce privește motilitatea de tip *swarming*, s-a observat un aspect compact al coloniei, determinat de deplasarea uniformă a celulelor bacteriene din punctul în care a fost făcută inocularea pe mediul NB cu pH 7 (control) - Figura IV.2-B. La pH 5 s-a evidențiat o zonă mai pronunțată în jurul coloniei din centrul plăcii, densitatea celulelor bacteriene scăzând spre periferie. În condițiile cultivării tulpinii *B. velezensis* P3.3S pe mediu cu pH 6 s-a observat un aspect total diferit față de celelalte valori de pH testate, coloniile formând două inele la suprafața mediului, inelul din centrul plăcii fiind și în acest caz mai pronunțat. La pH 8 și 9 celulele s-au deplasat simetric și uniform, acest tip de motilitate caracterizându-se prin mișcarea de grup a celulelor (Figura IV.2-B).

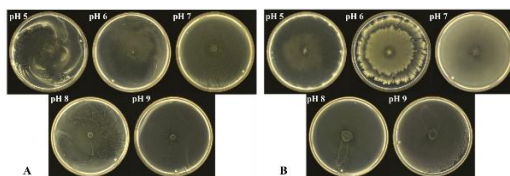


Figura IV.2. Influența pH-ului asupra motilității de tip *swimming* (A) și *swarming* (B) a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S. Cultivarea s-a realizat pe mediul NB cu 0,3%, respectiv 0,5% agar timp de 24 h. Controlul a fost reprezentat de mediul de cultură NB cu pH = 7

Cultivarea tulpinii bacteriene *B. velezensis* P3.3S pe mediu NB semisolid a evidențiat faptul că cele două tipuri de motilitate nu sunt afectate de concentrațiile de NaCl utilizate, celulele bacteriene fiind capabile să se deplaseze pe întreaga suprafață a mediului chiar și la o concentrație de 40 g/L (Figura IV.3). De asemenea, aspectul coloniilor dezvoltate la suprafața mediului nu este la fel de diferit, ca în cazul celor identificate în cadrul investigațiilor privind efectul pH-ului.

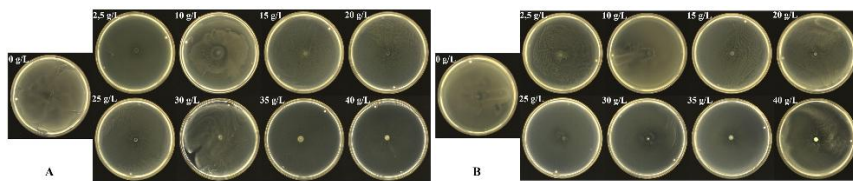


Figura IV.3. Influența concentrațiilor de NaCl (g/L) asupra motilității de tip *swimming* (A) și *swarming* (B) a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S. Cultivarea s-a realizat pe mediul NB cu 0,3%, respectiv 0,5% agar timp de 24 h. Valorile din figură reprezintă concentrații de NaCl. Controlul a fost reprezentat de mediu NB cu 0 g/L NaCl

În urma cultivării tulpinii *B. velezensis* P3.3S pe mediul NB suplimentat cu diferite concentrații de PEG₈₀₀₀ se poate remarca faptul că celulele bacteriene s-au deplasat pe suprafața mediului chiar și atunci când conținutul de apă din mediu a fost mai scăzut, cu mențiunea că la concentrații de 20% PEG aspectul coloniei a fost unul neuniform, celulele deplasându-se neordonat atât în cazul cultivării pe mediu NB cu 0,3%, respectiv 0,5% agar (Figura IV.4).

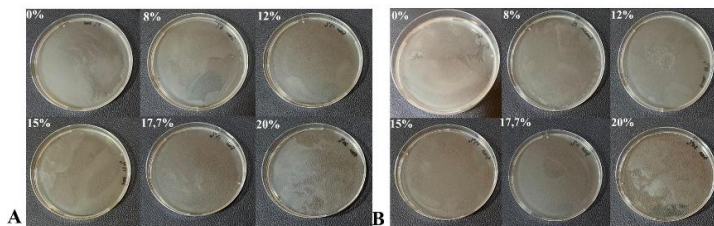


Figura IV.4. Influența concentrațiilor de PEG₈₀₀₀ asupra motilității de tip *swimming* (A) și *swarming* (B) a tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S. Cultivarea s-a realizat pe mediul NB cu 0,3%, respectiv 0,5% agar timp de 24

h. Procentajele din figură reprezintă concentrațiile de PEG₈₀₀₀ cu care a fost suplimentat mediul NB. Controlul a fost reprezentat de mediul NB cu 0% PEG₈₀₀₀.

IV.2.4. Tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S poate forma biofilme în condiții de stres abiotic

Biomasa biofilmului a variat în urma cultivării la valori diferite de pH (Figura IV.5). Cea mai mare cantitate de biofilm a fost observată la pH 6, unde s-a înregistrat o valoare maximă a absorbanței de 9,62, semnificativă statistic comparativ cu valoarea de absorbantă determinată în cazul controlului (pH 7 = 8,72). Spre deosebire de control (pH 7), pH-ul acid (5) a determinat o scădere a cantității de biofilm bacterian format (7,70). Rezultate similare au fost obținute în urma cultivării tulpinii *B. velezensis* P3.3S în mediul LB cu pH 8 și 9, evidențiindu-se o reducere a cantității de biofilm (pH 8 = 2,08; pH 9 = 1,96), semnificativă statistic, atunci când tulpina este supusă pH-ului alcalin (Figura IV.5).

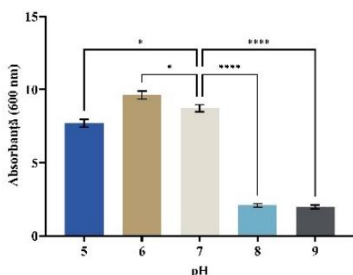


Figura IV.5. Influența pH-ului asupra capacității tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S de a forma biofilm în mediul LB timp de 48 h. Controlul este reprezentat de biofilmul format în mediul LB cu pH 7. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,5$, **** = $< 0,001$).

Creșterea concentrațiilor de NaCl în mediul de cultură determină o scădere semnificativă a cantității de biofilm format de către tulpina *B. velezensis* P3.3S (Figura IV.6). Astfel, biomasa maximă se înregistrează la o concentrație de 10 g/L NaCl (8,72), valoare considerată controlul experimentului. În urma suplimentării mediului LB cu 2,5 g/L NaCl s-a remarcat o scădere semnificativă a cantității de biofilm format (7,61), comparativ cu varianta control. De asemenea, o reducere a valorilor de absorbantă înregistrate a fost observată pe măsură ce concentrațiile de NaCl utilizate au crescut. Astfel, valorile de absorbantă citite la spectrofotometru au variat între 0,904 (40 g/L NaCl) și 2,06 (15 g/L NaCl) și au fost diferite din punct de vedere statistic față de control (8,72), conform testului Tukey realizat.

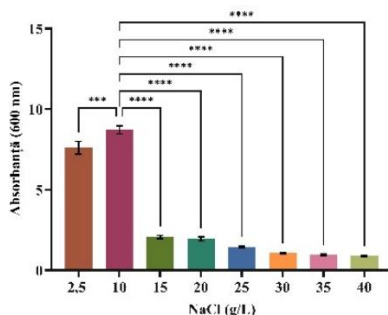


Figura IV.6. Influența salinității asupra capacității tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S de a forma biofilm în mediul LB timp de 48 h. Controlul a fost reprezentat de biofilmul format în mediul LB suplimentat cu 10 g/L NaCl. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (** = $p < 01$, **** = $p < 0001$).

Rezultatele obținute ca urmare a cultivării tulpinii *B. velezensis* P3.3S în mediul LB suplimentat cu diferite concentrații de PEG₈₀₀₀, utilizat pentru a simula stresul hidric, au evidențiat un comportament diferit al tulpinii comparativ cu cel observat atunci când a fost testată influența pH-ului și salinității. Dacă anterior potențialul tulpinii de a forma biofilm a scăzut concomitent cu creșterea pH-ului și concentrațiilor de NaCl, în acest caz biomasa biofilmului format a crescut semnificativ pe măsură ce concentrația de PEG 8000 din mediu crește până la 15%, rămânând aproximativ constantă la 17,7 și 20% PEG₈₀₀₀, spre deosebire de control (0% PEG₈₀₀₀). Valorile de absorbantă determinate au fost cuprinse între 8,63 (0% PEG) și 32,11 - valoare înregistrată la 15% PEG.

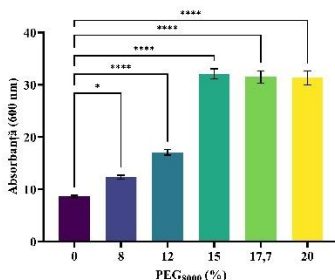


Figura IV.7. Influența concentrațiilor de PEG₈₀₀₀ asupra capacității tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S de a forma biofilm în mediul LB timp de 48 h. Controlul a fost reprezentat de mediul LB care nu a fost suplimentat cu PEG₈₀₀₀. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 05$, **** = $p < 0001$).

IV.2.5. Arhitectura biofilmelor formate de *Bacillus velezensis* P3.3S în condiții de stres

Fotografiile obținute folosind SEM au evidențiat faptul că morfologia biofilmului format de *Bacillus velezensis* P3.3S este diferită în funcție de factorul de stres investigat (Figura IV.8). Biofilmului format la pH 7 (control) prezintă aspect de scoarță de copac, la suprafața căreia se remarcă prezența unor canale (marcate cu săgeți galbene) la suprafața biofilmului (Figura IV.8-A). O morfologie similară cu cea a biofilmului format la pH 7 se poate observa și la 20 g/L NaCl (Figura IV.8-M).

În comparație cu controlul, o morfologie distinctă a fost observată în cazul biofilmului format la 2,5 g/L NaCl și 8% PEG₈₀₀₀, unde se observă că celulele bacteriene sunt organizate sub formă de lanțuri care se împletesc într-o rețea complexă, conferind biofilmului un aspect spongios (Figura IV.8-J, K, L, P).

Morfologia biofilmului format la 15% PEG₈₀₀₀ este diferită comparativ cu controlul, dar și față de celelalte biofilme analizate. Biofilmul format la această concentrație este format din celule bacteriene mici dispuse sub formă de lanțuri groase (Figura IV.8-S), înglobate într-o matrice care are rolul cel mai probabil de a proteja celulele de stresul osmotic (Fessia et al., 2022).

Biofilmele formate de tulpina *B. velezensis* P3.3S în condițiile de stres testate prezintă o structură complexă, celulele bacteriene fiind strâns unite între ele cel mai probabil datorită producerii de substanțe polimerice extracelulare - EPS (marcate cu săgeți albe) (Bridier et al., 2013). Aceste EPS conferă biofilmelor un aspect gelatinos, ce a fost observat înainte de deshidratarea biofilmelor pentru vizualizarea la SEM. EPS care formează matricea biofilmului au fost cel mai bine evidențiate în cazul biofilmului format la pH 9 (Figura IV.8-G, H). Această matrice mucoidă nu a permis vizualizarea celulelor încorporate în biofilm, observându-se doar forma acestora, însă o zonă mică din biofilm a confirmat prezența bacteriilor sub matrice (Figura IV.8-I).

Prezența substanțelor polimerice extracelulare (EPS) a fost observată și în cazul celorlalte biofilme analizate. În control și la 20 g/L NaCl, EPS au prezentat un aspect asemănător unei rețele de tip pânză de păianjen (marcate cu săgeți albe), învăluind celulele bacteriene (Figura IV.8-C). În urma expunerii celulelor bacteriene la diferite concentrații de PEG₈₀₀₀ (8 și 15%) s-a remarcat faptul că celulele bacteriene sunt înglobate în totalitate într-o substanță amorfă. Examinarea atentă a suprafeței biofilmului a evidențiat grupuri de granule (marcate cu săgeți albastre) - Figura IV.8-Q, T.

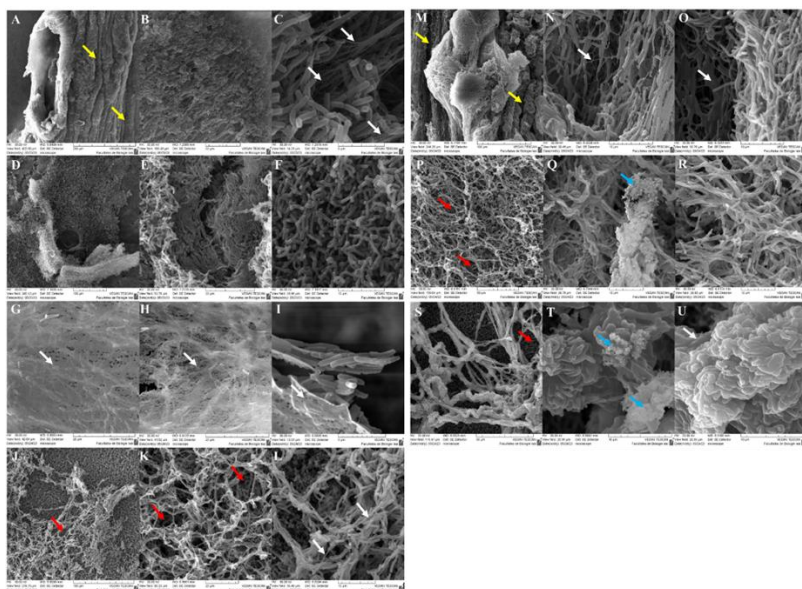


Figura IV.8. Imagini electronomicroscopice prezentând morfologia biofilmului format în condiții de stres abiotic de către tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S: Control (A, B, C), pH 5 (D, E, F), pH 9 (G, H, I), 2,5 g/L NaCl (J, K, L), 20 g/L NaCl (M, N, O), 8% PEG₈₀₀₀ (P, Q, R), 15% PEG₈₀₀₀ (S, T, U). Controlul a fost reprezentat de biofilmul format în mediul LB cu pH 7, 10 g/L NaCl și 0% PEG₈₀₀₀. Biofilmele au fost formate pe filtre cu pori de 0,45 μm, prin incubare 48 ore în mediul LB la 30 °C. Săgețile albe marchează prezența substanțelor polimerice extracelulare. Săgețile galbene marchează prezența canalelor. Săgețile albastre indică granulele de EPS; Săgețile roșii indică spațiile din interiorul biofilmului.

Tulpina testată a format un biofilm puternic, compact și foarte dens pe suprafața lamelei de sticlă în condițiile cultivării în mediul LB cu pH 7 și 10 g/L NaCl (varianta considerată controlul experimentului) - Figura IV.9. Rezultatele obținute au arătat că biofilmele formate de această tulpină au o conformație ce variază în funcție de condiția testată. Astfel, s-a evidențiat gruparea caracteristică în lanțuri a celulelor bacteriene din biofilm atunci când sunt cultivate în mediu cu pH 5 (Figura IV.9-A, pH 5). Atât la o concentrație de 20 g/L NaCl, cât și la cea de 40 g/L NaCl s-au putut observa goluri în interiorul biofilmului care se datorează cel mai probabil formării de biofilm în jurul cristalelor de sare formate la suprafața lamelei de sticlă și evidențiate în câmp luminos (Figura IV.9-A, 20 g/L și 40 g/L NaCl). În urma analizei fotografiilor 2D realizate la 8% PEG₈₀₀₀ se poate remarca faptul că biofilmul format este foarte subțire, fiind atașate de suprafața lamelei de sticlă doar câteva celule (Figura IV.9-A, 8% PEG₈₀₀₀). Totuși, în urma proiecției 3D a fotografiilor realizate s-a constatat că biofilmul format este unul compact și foarte dens (Figura IV.9-B, 8% PEG₈₀₀₀). În coloana C din

Figura IV.9 se pot observa straturile de celule din interiorul biofilmului, indicând o grosime diferită a acestuia în funcție de condiția testată. Grosimea biofilmului poate fi vizualizată și prin intermediul coloanei D din Figura IV.9 care reprezintă intensitatea fluorescenței biofilmului format. Intensitatea fluorescenței este dependentă de numărul de straturi de celule, prin urmare, atunci când biofilmul conține mai multe straturi de celule intensitatea fluorescenței va fi mai crescută. Totodată, coloana D evidențiază aspectul neregulat al biofilmelor formate în condiții de stres, așa cum este menționat în literatura de specialitate (Mishra et al., 2022).

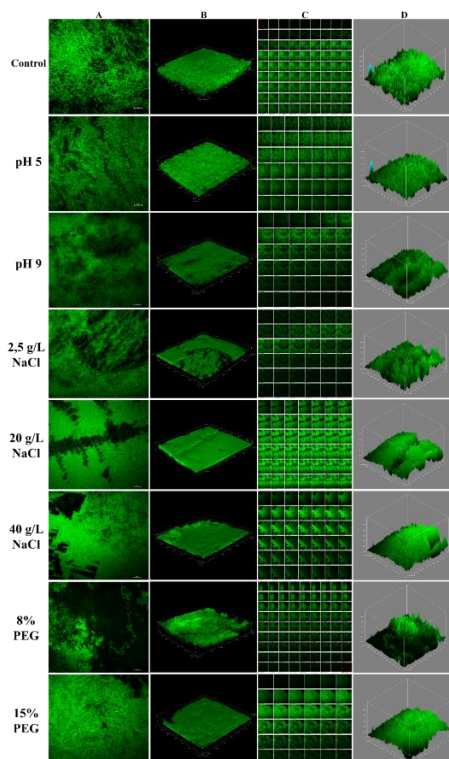


Figura IV.9. Arhitectura biofilmului matur format de tulpina *B. velezensis* P3.3S în diferite condiții de stres vizualizată la microscopul confocal cu scanare laser: A – fotografii 2D; B – proiecția 3D a fotografiilor; C – straturile de celule bacteriene din interiorul biofilmului; D – reprezentarea grafică a intensității fluorescenței din fotografiile 2D realizată cu ImageJ. Biofilmele au fost formate pe lamele de sticlă, prin incubare 48 ore la 30 °C. Celulele din biofilm au fost marcate fluorescent cu acridine orange 0,1%, iar vizualizarea acestora s-a realizat la obiectivul de 100×. Controlul a fost reprezentat de biofilmul format în mediul LB cu pH 7, 10 g/L NaCl și 0%

IV.2.6. Influența stresului abiotic asupra hidrofobicității suprafeței celulare

Procentajul de hidrofobicitate a celulelor bacteriene cultivate în mediu NB cu valori diferite ale pH-ului a variat între 40,25% și 66,45% (Figura IV.12). Analiza datelor experimentale a evidențiat absența unor diferențe semnificative între procentajele de hidrofobicitate celulară determinate la pH 6, 8 și 9, comparativ cu pH-ul 7 (control). Aceste rezultate sugerează că tulpina *B. velezensis* P3.3S își menține caracterul hidrofoab relativ constant la aceste valori de pH, indicând o bună adaptabilitate la condiții acide sau alcaline. Interesant este faptul că la pH 5 s-a înregistrat cel mai ridicat procentaj de celule hidrofoabe (66,45%). Cu toate acestea, pH 5 nu s-a corelat cu o creștere a biomasei biofilmului.

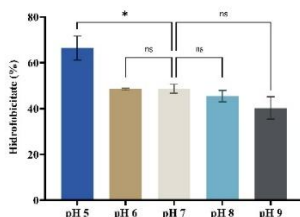


Figura IV.12. Influența pH-ului asupra hidrofobicității suprafeței celulelor de *Bacillus velezensis* P3.3S cultivate în mediul NB timp de 24 h. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Controlul este reprezentat de procentajul de hidrofobicitate obținut la pH 7. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0.05$; ns – lipsa diferențelor semnificative).

Hidrofobicitatea celulelor bacteriene cultivate în mediul NB suplimentat cu diferite concentrații de NaCl a variat între 8,58% și 44,73% (Figura IV.13). S-a observat o scădere semnificativă a procentajului de hidrofobicitate începând cu concentrația de 15 g/L, comparativ cu varianta control (0 g/L NaCl), ceea ce sugerează că stresul salin afectează negativ proprietățile de suprafață ale celulelor bacteriene.

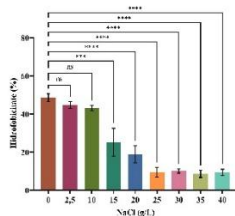


Figura IV.13. Influența salinității asupra hidrofobicității suprafeței celulelor de *Bacillus velezensis* P3.3S cultivate în mediul NB timp de 24 h. Controlul este reprezentat mediu de cultură cu 0 g/L NaCl. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$); ns – lipsa diferențelor semnificative.

Concentrațiile de PEG₈₀₀₀ utilizate au influențat în mod negativ hidrofobicitatea suprafeței celulelor bacteriene, deși formarea de biofilm a fost stimulată în aceste condiții. Procentajul de hidrofobicitate scade semnificativ față de control (0% PEG₈₀₀₀ - 46,49%) pe măsura creșterii concentrației de polietilenglicol, până la o valoare minimă de 22,02% (Figura IV.14).

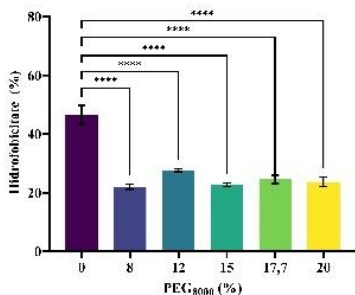


Figura IV.14. Influența concentrațiilor de PEG₈₀₀₀ asupra hidrofobității suprafeței celulelor tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S cultivate în mediul NB timp de 24 h. Controlul este reprezentat de mediu de cultură cu 0% PEG₈₀₀₀. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (**** = $p < 0.0001$).

IV.2.7. Stresul abiotic nu influențează producerea de exopolizaharide

Cantitățile de exopolizaharide produse de tulpina bacteriană *B. velezensis* P3.3S cultivată în mediul LB cu valori de pH variabile au fost cuprinse între 708 și 81,68 $\mu\text{g/mL}$ (Figura IV.15). S-a observat o ușoară creștere a producției de exopolizaharide în condiții de pH acid sau alcalin, comparativ cu pH-ul neutru (pH 7), ceea ce poate sugera un răspuns adaptativ al bacteriei la stresul cauzat de modificările de pH.

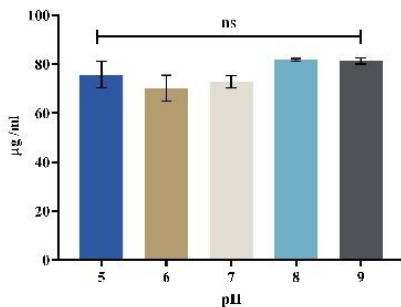


Figura IV.15. Influența pH-ului asupra capacității tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S de a produce exopolizaharide prin cultivare în mediul LB timp de 48 h. Controlul a fost reprezentat de mediu de cultură cu pH 7. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. ns – lipsa diferențelor semnificative.

În urma cultivării tulpinii bacteriene *B. velezensis* P3.3S în mediul LB suplimentat cu diferite concentrații de NaCl s-a observat că producerea de exopolizaharide variază între 52,96 și 85,95 $\mu\text{g/mL}$ (Figura IV.16). Analiza rezultatelor obținute a evidențiat faptul că în condițiile cultivării la o concentrație 2,5 g/L NaCl cantitatea înregistrată este semnificativ mai mică în comparație cu cea determinată la 10 g/L, considerată controlul experimentului. Conținutul de exopolizaharide crește ușor la o concentrație de 15 g/L NaCl și se menține relativ constant pe măsură ce concentrațiile de clorură de sodiu la care sunt expuse celulele cresc, însă această creștere nu este semnificativă statistic comparativ cu controlul (10 g/L NaCl) - Figura IV.16.

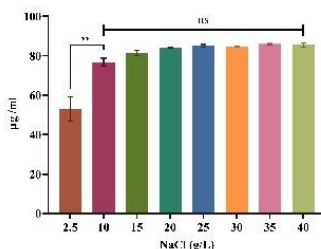


Figura IV.16. Influența salinității asupra capacității tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S de a produce de exopolizaharide. Controlul a fost reprezentat de mediu de cultură suplimentat cu 10 g/L NaCl. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

Asteriscul marchează diferențele semnificative (** = $p < 01$); ns – lipsa diferențelor semnificative.

Stresul hidric indus de PEG₈₀₀₀ a condus la o ușoară creștere a producției de exopolizaharide în urma cultivării celulelor bacteriene în mediul LB suplimentat cu concentrații de PEG $\geq 8\%$ (85,06 $\mu\text{g/mL}$), comparativ cu controlul (0% PEG₈₀₀₀ - 76,78 $\mu\text{g/mL}$) - Figura IV.17.

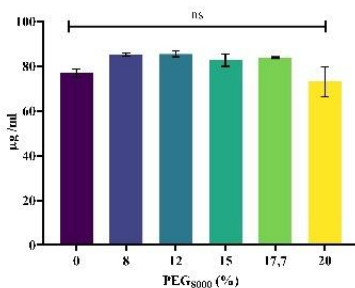


Figura IV.17. Influența PEG asupra capacității tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S de a produce de exopolizaharide. Controlul a fost reprezentat de mediu de cultură cu 0% PEG₈₀₀₀. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. ns – lipsa diferențelor semnificative.

CAPITOLUL V. TOLERANȚA TULPINII *BACILLUS SAFENSIS* P1.5S LA FACTORI DE STRES ABIOTIC ȘI EFECTUL ACESTORA ASUPRA POTENȚIALULUI DE SOLUBILIZARE A FOSFORULUI

V.1. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Experimentele realizate în cadrul acestui capitol s-au realizat în condiții de stres abiotic reprezentat de pH (5 și 9), temperatură (20 °C și 37 °C) și salinitate (concentrații de NaCl – 2,5, 10 și 15 g/L NaCl).

V.1.1. Identificarea genelor implicate în toleranța la stresul abiotic și în solubilizarea compușilor cu fosfor

Pentru identificarea genelor de interes a fost utilizat algoritmul BLAST (Camacho et al., 2009). Genele cu o identitate mai mare de 30% și un procentaj de acoperire de peste 70% au fost considerate *hit-uri* pozitive.

V.1.2. Evaluarea creșterii tulpinii P1.5S într-o cultură discontinuă asincronă

Evidențierea efectului stresului abiotic cauzat de pH, temperatură și salinitate s-a apreciat urmărind dinamica creșterii tulpinii *B. safensis* P1.5S într-o cultură discontinuă asincronă.

V.1.3. Determinarea cantității de fosfor solubilizat

Capacitatea tulpinii P1.5S de a solubiliza fosfatul tricalcic în condiții de stres a fost evaluată utilizând metoda fosfomolibdatului de amoniu.

V.1.4. Aprecierea creșterii folosind tehnica numărării coloniilor

În vederea stabilirii unei corelații între cantitatea de fosfat tricalcic solubilizat și creșterea tulpinii bacteriene P1.5S în mediul PVK s-a determinat numărul de unități formatoare de colonii (UFC)/mL.

V.1.5. Identificarea și cuantificarea acizilor organici prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

Producerea de acizi organici a fost evaluată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță, care este o tehnică de separare a componentelor prezente într-un amestec de molecule chimice sau biologice, în funcție de eluția lor, în momentul trecerii unei faze mobile (eluent) printr-o fază staționară (coloană) la o presiune înaltă. Componentele separate sunt detectate și înregistrate sub forma unei cromatograme (Mallik et al., 2016).

V.1.6. Evaluarea activității fosfatazelor acide și alcaline

Fosfatazele acide și alcaline din probele de analizat au capacitatea de a hidroliza, în condiții determinate, legătura esterică a para-nitrofenilfosfatului cu formarea de para-nitrofenol și fosfat. În mediul alcalin, para-nitrofenolul prezintă culoare galbenă, ceea ce permite citirea intensității la spectrofotometru la o lungime de undă de 410 nm (Artenie et al., 2008).

V.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

V.1.1. Toleranța tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S la stresul abiotic

Analiza BLAST realizată a evidențiat prezența a 56 de gene care conferă toleranță la variații de pH, fluctuații de temperatură, salinitate și secetă în genomul în *draft* al tulpinii *B. safensis* P1.5S. Procentajul de acoperire a variat între 80 și 100%, iar cel de identitate a fost cuprins între 30,05 și 98,46%. În ceea ce privește adaptarea și supraviețuirea celulelor bacteriene la valori extreme de pH, în genomul în *draft* al tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S s-au identificat o serie de gene (15) responsabile de aceste procese, printre cele mai importante numărându-se operonul *atp* format din 8 gene (*atpABCDEFGH*). În genomul în *draft* al tulpinii *B. safensis* P1.5S s-a constatat prezența a 26 de gene responsabile de adaptarea și supraviețuirea la temperaturi scăzute (*cspB*, *cspC*, *cspD*) sau ridicate (*grpE*, *ywiE*, *groESL*, *dnaKJ*, *clpAYXPE*, *hrcA*, *ctsR*, *cssSR*, *mcsAB*, *rsbVW*, *sigAB*, *htrAB*). De asemenea, genomul în *draft* al tulpinii *B. safensis* P1.5S prezintă gene (16) care intervin atunci când bacteriile sunt cultivate în condiții de stres osmotic ce poate fi cauzat de salinitate sau secetă: *fisH*, *lysC*, *pyrC*, *tuf*, *glpT*, *metK*, *yuaI*, *glmS*, *glsA1*, *ispH*, *gpmI*, *dapF*, *yugJ*, *yugL*, *metC*.

Bacteriile pot răspunde la stresul abiotic prin producerea de osmoliți. Prin urmare, în genomul în *draft* al tulpinii *B. safensis* P1.5S s-au identificat 20 de gene, 5 (*proA*, *proB*, *proC/proH*, *proI*, *proJ*) sunt responsabile cu producerea de prolină, 5 (*gbsA*, *gbsB*, *opuAB*, *opuAC*, *opuD*) sunt implicate în sinteza și transportul glicin-betainei, 3 (*treA*, *treP*, *treR*) intervin în transportul trehalozei, iar ultimele 7 (*gltA*, *gltB*, *gltD*, *gltT*, *gdhA*, *glnA*, *rocG*) codifică sinteza de glutamat.

În genomul tulpinii *B. safensis* P1.5S s-au identificat 28 gene care ameliorează stresul oxidativ cauzat de factorii de stres. Dintre acestea, patru gene sunt responsabile de biosinteza bacilitiolului (BSH), un tiol cu greutate moleculară mică implicat în apărarea celulelor bacteriene de stresul oxidativ (*bshA*, *bshB1*, *bshB2*, *brxABC*, *ypd*). În ceea ce privește enzimele antioxidante, genomul tulpinii de interes conține gene responsabile de producerea superoxid dismutazei (*sodA*), tiol peroxidazei (*tpx*), glutation peroxidazei (*bsaA/gpx*), achil hidropoxid reductazei (*ahpC*), bacilopeptidazei (*bpr*), mangan catalazei (*ydbD*), glutation hidroxilazei (*ggt*), glicolat oxidazei (*gldD*), peroxiredoxinei (*bcp*), catalază (*katA*), gliceraldehid – 3 – fosfat – dehidrogenază (*gapA* și *gapB*, antranilat sintazei (*pabA*).

Rezultatele obținute au arătat că incubarea la 37°C a îmbunătățit semnificativ creșterea tulpinii *B. safensis* P1.5S comparativ cu controlul (28°C) pe tot parcursul derulării experimentului, indicând o toleranță crescută de a crește la temperaturi ridicate. Pe de altă parte, temperatura de incubare mai scăzută (20°C) a fost asociată cu o scădere a creșterii comparativ cu controlul (Figura V.1-A). Investigarea influenței variațiilor de pH asupra creșterii tulpinii *B. safensis* P1.5S a evidențiat diferențe semnificative între densitățile optice determinate în urma cultivării în mediul LB cu pH 5, pH 9 și pH 7 – control. Totuși, tulpina utilizată a arătat o capacitate de adaptare și supraviețuire atât la un pH acid (5), cât și la unul alcalin (9) (Figura V.1-B). În ceea ce privește influența salinității asupra creșterii tulpinii *B. safensis* P1.5S, rezultatele obținute au arătat că tulpina *B. safensis* P1.5S se dezvoltă indiferent de concentrația de NaCl testată (2,5, 10 și 15 g/L) (Figura V.1-C).

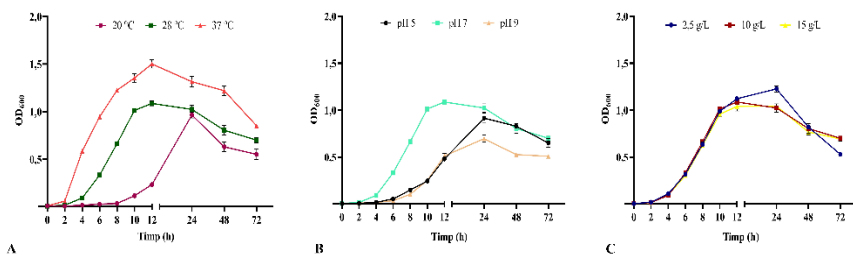


Figura V.3. Influența temperaturii, pH-ului și salinității asupra dinamicii creșterii tulpinii *B. safensis* P1.5S cultivată în mediul LB pe parcursul a 72 de ore. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei.

V.1.2. Influența stresului abiotic asupra solubilizării P anorganic de către *B. safensis* P1.5S

Analizând comparativ rezultatele obținute în ceea ce privește efectul temperaturii de incubare asupra capacității de solubilizare a tulpinii *B. safensis* P1.5S, se poate observa că procesul de solubilizare a fost optim la o valoare de 20°C, observându-se o creștere a cantității de fosfor solubilizate la 5 și 7 zile după inoculare (ZDI), comparativ cu valorile de fosfor solubil înregistrate în urma incubării tulpinii la 28°C (control) - Figura V.2-A. În raport cu cantitatea de fosfor solubil înregistrată la 5 ZDI în urma incubării culturii bacteriene la 28°C (control), s-a constatat o scădere semnificativă a valorii de fosfor solubilizat atunci când tulpina este incubată la 37°C.

Rezultatele obținute au demonstrat faptul că procesul de solubilizare este dependent de numărul de celule bacteriene prezente în mediul PVK. În relație cu controlul (28°C), creșterea celulelor bacteriene din mediul PVK a fost stimulată în urma incubării la o temperatură mai scăzută (20°C). Această creștere a fost corelată cu un potențial de solubilizare a fosforului mai pronunțat la 5 și 7 ZDI, comparativ cu cantitățile de fosfor determinate la aceste citiri în control. Pe de altă parte, incubarea la 37°C a determinat o creștere mai redusă a celulelor bacteriene, în comparație cu controlul

și 20°C, prezentând cel mai mic număr de celule viabile prezente în mediul PVK la 10 DAI (Figura V.2-B).

Analizând comparativ valorile de pH obținute în urma solubilizării fosforului la diferite temperaturi de incubare s-a observat că tulpina *B. safensis* a determinat o acidificare similară a mediului PVK atunci când a fost incubată la 28°C și 37°C, cu o singură excepție înregistrată la 10 ZDI, când pH-ul a fost semnificativ mai scăzut la 37°C (Figura V.2-C).

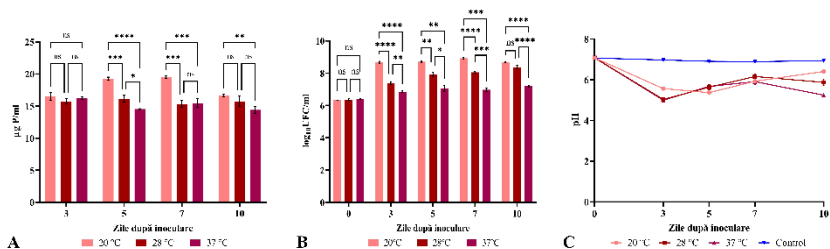


Figura V.2. Dinamica solubilizării fosfatului tricalcic (A), creșterea tulpinii bacteriene (B) și variația pH-ului (C) în urma incubării tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S la diferite temperaturi de incubare pe parcursul a 10 zile. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată la 28°C în mediul PVK. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$); ns – nu există diferențe semnificative.

Cultivarea tulpinii bacteriene P1.5S în mediul PVK cu pH inițial de 7 a determinat solubilizarea unor cantități de fosfor cuprinse între 15,33 și 16,16 $\mu\text{g P/mL}$. Pe de altă parte, în urma cultivării la un pH inițial de 9 s-a observat un potențial de solubilizare mai ridicat spre deosebire de pH 7, valorile determinate variind între 14,69 și 18,73 $\mu\text{g P/mL}$. Între cele două valori de pH testate s-au identificat diferențe semnificative la 5 și 7 zile după inoculare, indicând un potențial mai crescut al tulpinii *B. safensis* P1.5S de a solubiliza fosfatul tricalcic în urma cultivării în mediul PVK cu pH inițial 9 (Figura V.3-A). În ceea ce privește creșterea tulpinii P1.5S cultivată în mediu PVK cu un pH inițial neutru (7) se observă o creștere graduală a numărului unităților formatoare de colonii până la 10 zile, cu valori cuprinse între 6,36 și 8,38 $\log_{10}$ UFC/mL. În urma inoculării tulpinii în mediul PVK cu un pH inițial alcalin (9), numărul maxim de celule bacteriene a fost identificat la 10 zile după inoculare (8,20 $\log_{10}$ UFC/mL) (Figura V.3-B). Concomitent cu procesul de solubilizare al fosforului s-a observat o scădere a pH-ului mediului de cultură. În cazul ambelor valori de pH testate s-a constatat că acest parametru scade semnificativ până la trei zile, când se înregistrează valoarea minimă, cu mențiunea că nu există o diferență semnificativă între valorile obținute în urma cultivării în mediu cu pH inițial neutru și alcalin (Figura V.3-C).

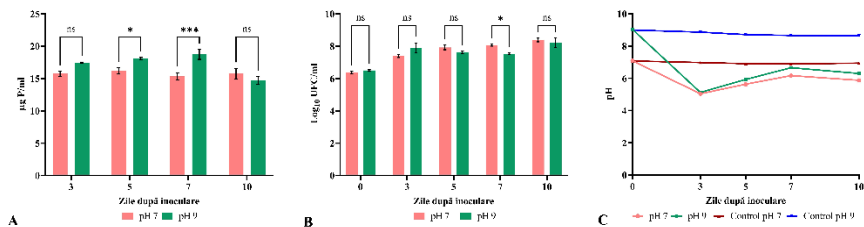


Figura V.3. Dinamica solubilizării fosfatului tricalcic (A), creșterea tulpinii bacteriene (B) și variația pH-ului (C) în urma incubării tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S în mediul PVK cu pH inițial 7 și 9 pe parcursul a 10 zile. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată la 28°C în mediul PVK. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$); ns – nu există diferențe semnificative.

Salinitatea nu a influențat capacitatea tulpinii *B. safensis* P1.5S de a solubiliza TCP din bulion PVK. Cantitatea de P solubil a variat între 14,72 și 16,89 $\mu\text{g P/mL}$, fără diferențe semnificative înregistrate între control (0,150 g/L) și diferite concentrații de NaCl (2,5 g/L, 10 g/L și 15 g/L) (Figura V.4-A). Cu toate acestea, concentrațiile crescute de NaCl au stimulat creșterea la 3, 5 și 7 DAI, sugerând că tulpina P1.5S prezintă toleranță la salinitate (Figura V.4-B).

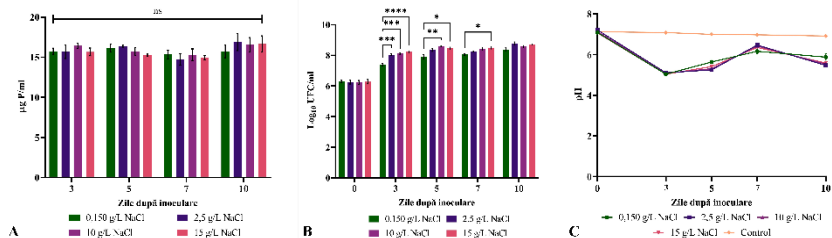


Figura V.3. Dinamica solubilizării fosfatului tricalcic (A), creșterea tulpinii bacteriene (B) și variația pH-ului (C) în urma incubării tulpinii *Bacillus safensis* P1.5S în mediul PVK suplimentat cu diferite concentrații de NaCl pe parcursul a 10 zile. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată la 28°C în mediul PVK. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$); ns – nu există diferențe semnificative.

V.2.3. Influența factorilor de stres abiotic asupra mecanismelor implicate în solubilizare

V.2.3.1. Acizii organici produși în condiții de stres abiotic

Analiza BLAST a genomului tulpinii *B. safensis* P1.5S a evidențiat prezența a cel puțin 32 de gene diferite despre care există informații în literatura de specialitate că intervin în biosinteza unor acizi organici implicați în solubilizarea compușilor insolubili cu fosfor (Shariati et al., 2017; Silva et al., 2021): acidul gluconic (*gdh*, *ycdF* și *kduD*), formic (*oxdD*), malic (*mdh*), citric (*gltA*, *acnA*, *icd*), lactic (*ldh*), acetic (*poxB*, *aldB*, *pdhABCD*, *acsA*) și succinic (*sucABD*, *sdhABC*).

Efectul temperaturii asupra producerii de acizi organici

Analiza comparativă a rezultatelor obținute la 3 zile cu privire la producerea de acizi organici de către tulpina bacteriană *B. safensis* P1.5S a arătat că între concentrațiile de acizi produși la 28°C (control) și 37°C nu există diferențe semnificative (exceptând acidul citric care nu a fost produs la 28°C), situație întâlnită și în cazul cantităților de fosfor solubilizate la cele două temperaturi. Spre deosebire de 28°C, la 20°C, s-a evidențiat prezența acizilor tartric și citric, însă concentrațiile de acizi malic/formic, lactic, acetic și succinic sunt mai mari la 28°C. Comparând concentrațiile acizilor organici eliberați în urma incubării tulpinii de interes la 20°C și 37°C s-a remarcat o mai bună producere a acizilor organici la o temperatură de 37°C. Totuși, cantitățile de fosfor determinate la cele două temperaturi nu au fost diferite din punct de vedere statistic.

Compararea concentrațiilor de acizi organici produși la 5 zile a arătat că în urma cultivării tulpinii *B. safensis* P1.5S la 20°C s-au obținut valori mai mari pentru acizii oxalic și malic, spre deosebire de 28°C și 37°C. Diferența de concentrație dintre acizii menționați ar putea explica de ce cantitatea de fosfor este mai mare la 20°C deoarece, conform constantei de aciditate, cei doi acizi sunt considerați cei mai eficienți în solubilizarea compușilor cu fosfor. Mai mult, la această valoare de temperatură sunt produși toți cei șapte acizi organici, în timp ce la 37°C nu s-a identificat prezența acidului tartric, iar la 28°C nu s-au produs acizii citric și acetic, drept pentru care se poate explica diferența semnificativă între conținutul de fosfor determinat. Între cantitățile de fosfor solubil înregistrate la 28°C și 37°C nu au fost stabilite diferențe semnificative, însă concentrațiile de acizi organici produși la aceste temperaturi au fost diferite. Astfel, la 28°C s-au obținut valori mai mari de acizi oxalic, tartric/gluconic, lactic și succinic spre deosebire de 37°C. Pe de altă parte, la temperatura de 37°C s-au evidențiat concentrații mai crescute de acizi malic/formic, citric și acetic, comparativ cu 28°C.

La 7 zile după inoculare s-a observat că nu există diferențe semnificative între concentrațiile acizilor oxalic, malic/formic, citric, lactic și acetic sintetizate la 28°C și 37°C. Singurele diferențe între cele două valori de temperatură testate se referă la acidul succinic care a fost produs într-o concentrație mai mare la 28°C, iar pe de altă parte conținutul de acid tartric/gluconic a

fost mai ridicat în urma cultivării la 37 °C, drept pentru care nu s-au putut stabili diferențe între cantitățile de fosfor solubilizate de tulpina *B. safensis* P1.5S în urma incubării la cele două valori de temperatură. La 20°C s-a înregistrat cea mai mare cantitate de fosfor solubil și cel mai crescut număr de celule bacteriene, însă în unele situații concentrațiile acizilor organici au fost mai scăzute (așa cum este cazul acizilor tartric/gluconic, acetic și succinic), fie nu au existat diferențe semnificative între valorile obținute (acizii oxalic, malic/formic, citric și lactic), comparativ cu temperaturile de 28°C și 37°C. Așa cum am menționat și anterior, există posibilitatea ca acizii organici produși la 20°C să fie utilizați ulterior ca sursă de energie, din moment ce numărul de celule bacteriene determinat din mediul PVK a fost cel mai crescut, spre deosebire de celelalte temperaturi. La 37°C, numărul de celule din mediu a fost cel mai scăzut, însă, cu toate acestea unii acizi organici au fost produși în concentrații mai mari, comparativ cu 28°C și 20°C.

Analiza comparativă a concentrațiilor acizilor organici produși la 10 zile la cele trei valori de temperatură testate a evidențiat lipsa unei diferențe semnificative între concentrațiile de acizi malic/formic și citric, care sunt considerați cei mai puternici acizi conform constantei de aciditate. Acidul lactic nu a mai fost identificat în supernatantul niciuneia dintre culturile incubate la cele trei valori de temperatură. Diferențe de concentrație s-au observat în cazul acidului oxalic (cea mai mare valoare a fost obținută la 20°C), tartric (nu a fost identificat la 20°C, iar cea mai mare concentrație s-a înregistrat la 37°C), acetic (produs în concentrații apropiate la 37°C și 28°C) și succinic (cea mai mare valoare s-a stabilit la 28°C, urmată de 20°C). La 10 zile după inoculare, cantitățile de fosfor determinate nu au fost diferite din punct de vedere statistic, fapt care poate fi pus pe seama variației concentrațiilor de acizi organici.

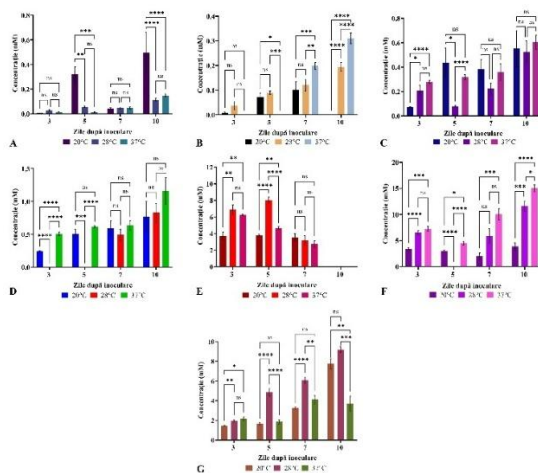


Figura V.5. Influența temperaturii asupra producerii de acizi organici de către tulpina *Bacillus safensis* P1.5S cultivată în mediul PVK pe parcursul a 10 zile de incubare: A – acid oxalic; B – acid tartric/gluconic,

C – acid malic/formic; D – acid citric; E – acid lactic; F – acid acetic; G – acid succinic. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată în mediul PVK la 28°C. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$); ns – lipsa diferențelor semnificative.

Efectul pH-ului asupra producerii de acizi organici

În urma comparării acizilor organici produși la un pH inițial de 7 (control) și 9 s-a observat că la 3 zile după inocularea tulpinii *B. safensis* P1.5S în mediul PVK s-au produs 5 acizi organici: oxalic, malic/formic, lactic, acetic, succinic în concentrații care nu sunt diferite statistic. Lipsa diferențelor semnificative între concentrațiile de acizi organici sintetizați la pH 7 și 9 a fost observată și în cazul cantităților de P solubilizate, numărului de celule bacteriene și pH-ului mediului.

La 5 zile după inoculare, atât la pH 7, cât și la pH 9 s-a evidențiat prezența a 5 acizi organici, însă 2 dintre aceștia au fost diferiți în funcție de pH-ul testat. Acizii care au fost produși la ambele valori de pH inițial sunt oxalic, lactic și succinic. În plus, la pH 7 se observă prezența acizilor malic/formic și tartric/gluconic, iar la pH 9 au fost identificați și acizii citric și acetic. Datele obținute cu privire la concentrațiile acizilor produși au arătat că nu există diferențe semnificative între acizii oxalic, lactic și succinic produși la pH 7 și 9. Totuși, s-a constatat că acizii citric și acetic produși la pH 9 au fost prezenți în concentrații mai crescute, spre deosebire de acizii eliberați în control. În plus, acidul citric este un acid tricarboxilic considerat puternic, eficient în solubilizarea fosfaților (Zuluaga et al., 2023). Acest fapt poate explica cantitatea mai mare de fosfor solubil determinată la pH 9, comparativ cu pH 7.

La 7 zile după inoculare se produc 8 acizi organici indiferent de valoarea de pH inițial testată: oxalic, tartric/gluconic, malic/formic, citric, lactic, acetic, succinic și un acid necunoscut. Acizii oxalic și succinic sunt produși în concentrații mai mari la pH 9, în timp ce valorile de concentrație ale celorlalți acizi nu sunt diferite din punct de vedere statistic. În urma cultivării tulpinii de interes în mediul PVK cu pH 9 se solubilizează mai mult fosfor cel mai probabil datorită producerii în concentrații mai mari a acizilor oxalic și succinic, comparativ cu controlul.

În cazul ultimei determinări realizate (10 ZDI) s-a constatat că deși nu există o diferență semnificativă între conținutul de fosfor solubil determinat la pH 7 și pH 9, au existat variații în ceea ce privește sinteza de acizi organici. Astfel, acidul lactic a fost evidențiat doar în urma cultivării tulpinii *B. safensis* P1.5S la un pH inițial de 9, iar acizii oxalic, acetic și succinic au fost produși în concentrații mai mari tot la pH 9, spre deosebire de pH 7. Pe de altă parte, pentru acidul malic/formic s-a obținut o concentrație mai mare la control.

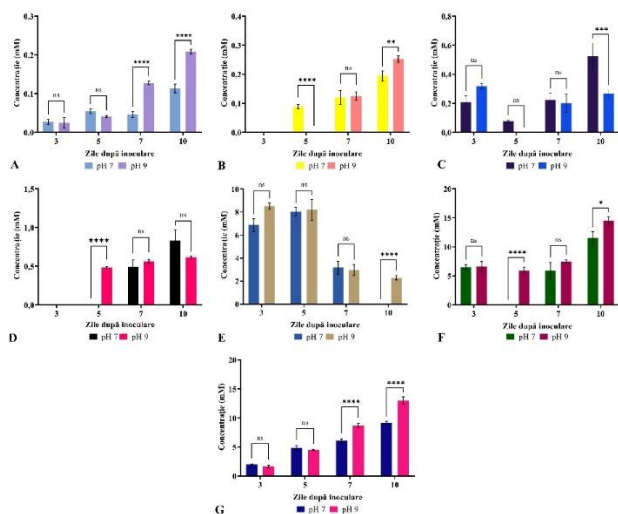


Figura V.6. Influența pH-ului asupra producerii de acizi organici de către tulpina *Bacillus safensis* P1.5S cultivată în mediul PVK pe parcursul a 10 zile de incubare: A – acid oxalic; B – acid tartric/gluconic, C – acid malic/formic; D – acid citric; E – acid lactic; F – acid acetic; G – acid succinic. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată în mediul PVK cu pH inițial 7. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (** = $p < 0,1$, *** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$); ns – lipsa diferențelor semnificative.

Efectul salinității asupra producerii de acizi organici

Analiza comparativă a cromatogramelor obținute în urma analizei HPLC a arătat că sinteza și eliberarea acizilor organici a variat în funcție de concentrațiile de NaCl utilizate pentru suplimentarea mediului PVK. La începutul perioadei de incubare (3 ZDI), cei trei acizi organici principali (lactic, acetic și succinic) au fost produși la toate concentrațiile de sare testate. Cu toate acestea, stresul salin a indus un model diferit de eliberare a acestor acizi. Astfel, *B. safensis* P1.5S a produs mai mult acid acetic în condiții de stres salin comparativ cu controlul (0,150 g/L NaCl), unde acidul lactic a fost eliberat ca acid predominant. În plus, acidul citric a fost detectat numai la cea mai mare concentrație de NaCl testată (15 g/L), în timp ce acizii tartric/gluconic și malic/formic nu au fost identificați la această concentrație. Acidul oxalic a fost detectat în bulionul PVK suplimentat cu diferite concentrații de NaCl, cu excepția celei de 10 g/L NaCl. La 5 ZDI, s-a constatat că producerea de acid lactic a scăzut odată cu creșterea concentrației de NaCl în mediul PVK. Similar cu controlul, acidul acetic nu a fost detectat la 10 g/L NaCl, dar a fost prezent la 2,5 și 15 g/L NaCl (6,03 mM, respectiv 4,72 mM). Salinitatea a inhibat producția de acizi succinic și oxalic, dar a stimulat eliberarea de acizi tartric/gluconic, cu o concentrație mai mare la 10 g/L NaCl (0,432 mM). La 7 ZDI, acizii citric, lactic

și succinic au fost sintetizați indiferent de concentrația de NaCl. Acizii acetic și oxalic nu au fost detectați în mediul PVK suplimentat cu 10 g/L NaCl, deși ambii acizi au fost prezenți în toate celelalte probe. La sfârșitul perioadei de incubare (10 ZDI), concentrațiile crescute de sare au inhibat producerea de acid oxalic, malic/formic, citric și acetic, dar au stimulat eliberarea de acid tartric/gluconic (în special la 10 g/L NaCl). La 15 g/L, nu au fost identificați acizii tartric/gluconic și malic/formic.

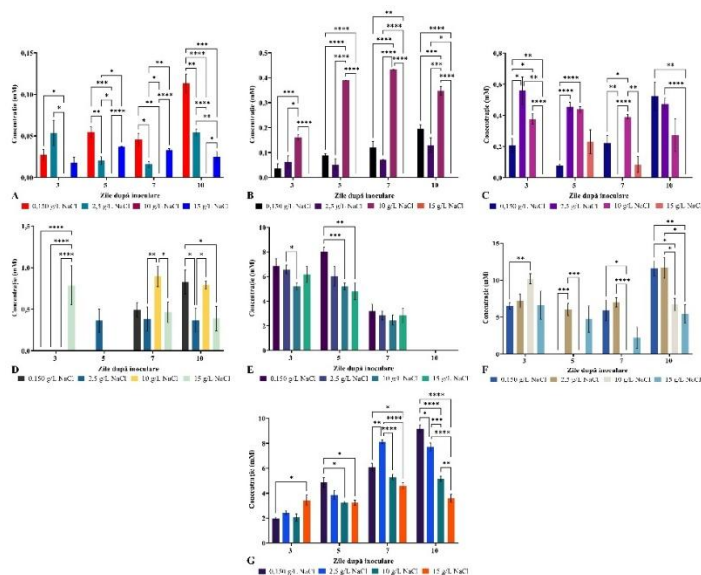


Figura V.7. Influența concentrațiilor de NaCl asupra producerii de acizi organici de către tulpina *Bacillus safensis* P1.5S cultivată în mediul PVK: A – acid oxalic; B – acid tartric/gluconic, C – acid malic/formic; D – acid citric; E – acid lactic; F – acid acetic; G – acid succinic. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată în mediul PVK ce conține 0,150 g/L NaCl. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).**

V.2.3.2. Activitatea fosfatazelor acidă și alcalină produse de *Bacillus safensis* P1.5S în condiții de stres

Analiza BLAST a evidențiat prezența a zece gene ce codifică sinteza fosfatazei acide și alcaline (*ycsE*, *yitU*, *phoABPR*, *subB*, *prpC*, *acpA*, *yqeG*).

Efectul temperaturii asupra activității fosfatazelor acide și alcaline

Rezultatele obținute au arătat că temperatura de incubare a influențat semnificativ activitatea fosfatazelor acide și alcaline produse de *B. safensis* P1.5S. Astfel, la mai multe determinări,

activitatea ambelor enzime a crescut la 20°C și 37°C comparativ cu controlul (28°C). Activitatea maximă (180,456 nmoli pNP/mL/h pentru fosfataza acidă și 157,867 nmoli pNP/mL/h pentru fosfataza alcalină) a fost înregistrată la 10 ZDI în culturile incubate la 20°C. O creștere a activității fosfatazei acide a fost indusă de incubarea la 20°C la 3 și 10 ZDI, în timp ce incubarea tulpinii P1.5S la temperaturi mai ridicate (37°C) a determinat o creșterea a activității la 5 ZDI (Figura V.16-A). La 7 ZDI nu s-au observat diferențe semnificative între activitatea fosfatazei acide înregistrată la valorile de temperatură testate. În cazul fosfatazei alcaline, s-a observat o activitate mai pronunțată la 3 și 5 ZDI în urma incubării la o temperatură de 37°C, comparativ cu controlul (28°C).

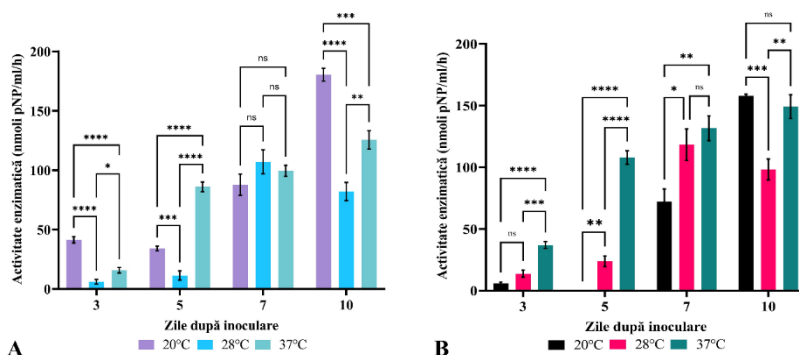


Figura V.7. Influența temperaturii asupra activității fosfatazei acide (A) și fosfatazei alcaline (B) produse de *Bacillus safensis* P1.5S cultivată în mediul PVK pe parcursul a 10 zile. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată la 28°C. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$); ns – lipsa diferențelor semnificative.

Efectul pH-ului asupra activității fosfatazelor acidă și alcalină

Rezultatele obținute au indicat că alcalinitatea nu a modificat semnificativ dinamica producției de fosfatază acidă și alcalină în timpul cultivării *B. safensis* P1.5S în mediul PVK cu pH-ul inițial ajustat la 9. Activitatea ambelor enzime a crescut ușor la pH 9 la 3 și 5 ZDI comparativ cu controlul (pH 7).

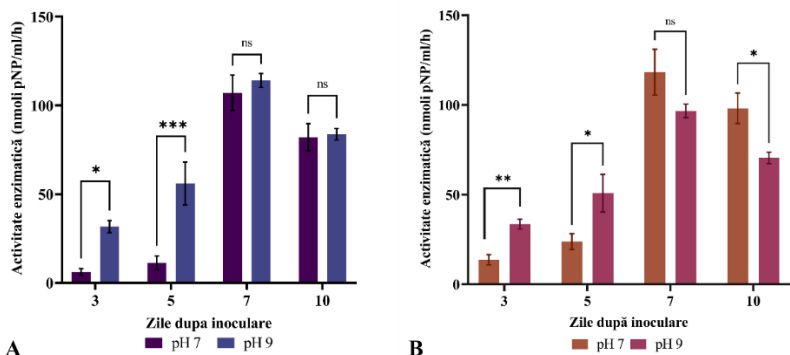


Figura V.9. Influența pH-ului asupra activității fosfatazei acide (A) și fosfatazei alcaline (B) produse de *Bacillus safensis* P1.5S. Controlul este reprezentat de cultura incubată în mediul PVK cu pH inițial 7. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (* = $p < 0,5$, ** = $p < 0,1$, *** = $p < 0,01$); ns – lipsa diferențelor semnificative.

Efectul salinității asupra activității fosfatazelor acidă și alcalină

Salinitatea nu a afectat activitatea fosfatazei acide și alcaline pe parcursul celor 10 zile de incubare (Figura V.9). Singura diferență semnificativă a fost înregistrată pentru fosfataza acidă la 5 ZDI, când concentrațiile mai mari de NaCl au inhibat activitatea enzimatică. Activitatea fosfatazei alcaline nu a fost diferită din punct de vedere statistic în urma cultivării tulpinii *B. safensis* P1.5S în mediul PVK suplimentat cu 2,5, 10 și 15 g/L NaCl, comparativ cu varianta control (0,150 g/L NaCl).

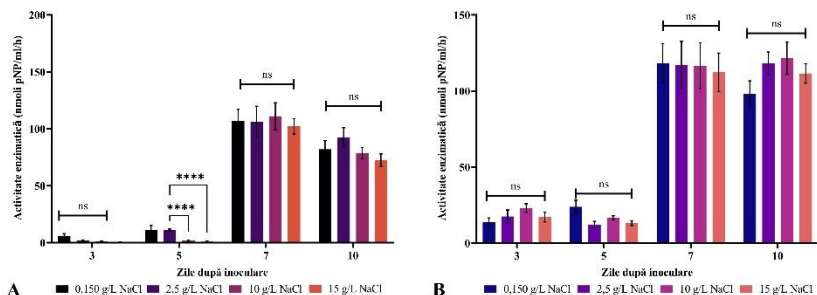


Figura V.9. Influența salinității asupra activității fosfatazei acide (A) și fosfatazei alcaline (B) produse de *Bacillus safensis* P1.5S. Controlul a fost reprezentat de cultura incubată în mediul PVK ce conținea 0,150 g/L NaCl. Valorile reprezentate constituie media a două determinări experimentale. Barele reprezintă eroarea standard a mediei. Asteriscul marchează diferențele semnificative (*** = $p < 0,01$); ns – lipsa diferențelor semnificative.

CONCLUZII

- Analiza literaturii de specialitate a evidențiat faptul că schimbările climatice manifestă efecte negative asupra creșterii și dezvoltării plantelor, dar și asupra bacteriilor rizosferice.
- Bacteriile asociate rizosferei plantelor pot prezenta mecanisme directe și indirecte care stimulează creșterea și ameliorează stresul abiotic la plante.
- Bacteriile tolerante la stresul abiotic produc osmoliți, antioxidanți și substanțe polimerice extracelulare pentru a se adapta și supraviețui în condiții nefavorabile.
- Eficiența bacteriilor benefice este condiționată de colonizarea cu succes a rădăcinilor plantelor prin intermediul unor mecanisme complexe: chemotaxie, motilitate, *quorum sensing* și formare de biofilm.
- În urma *screening*-ului calitativ și cantitativ realizat cu privire la unele mecanisme de stimulare a creșterii plantelor s-au selectat tulpinile P3.3S și P1.5S deoarece acestea posedă mecanisme multiple.
- Genomul în *draft* al tulpinii P3.3S prezintă o lungime de 3 860 972 pb (perechi de baze), în timp ce genomul în *draft* al tulpinii P1.5S are o lungime mai mică (3 667 318 pb).
- Genomurile asamblate au fost încărcate în NCBI GenBank și sunt accesibile cu numerele JARXQM000000000 (tulpina P3.3S), respectiv JARZFW000000000 (tulpina P1.5S).
- Tulpinile bacteriene P3.3S și P1.5S au fost identificate ca aparținând speciilor *Bacillus velezensis* și *Bacillus safensis* pe baza valorilor dDDH obținute.
- Conform adnotării funcționale a genomului tulpinii *B. velezensis* P3.3S realizată de *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) au fost prezise în total 3826 de gene, iar genomul tulpinii *B. safensis* P1.5S conține un număr total de 3748 de gene.
- În cazul tulpinii *B. velezensis* P3.3S, analiza antiSMASH a identificat prezența grupurilor de gene responsabile de producerea de poliketide (bacilaenă, difcicină, bacilizină, macrolactină H), lipopeptide (surfactină, fengicină, bacilomicină, iturină) și a sideroforului bacilibactină.
- Analiza antiSMASH a genomului tulpinii *B. safensis* P1.5S a permis identificarea unor grupuri de gene biosintetice legate cu sinteza de poliketide (bacilizină), lipopeptide (surfactină, lichenizină), siderofori (bacilibactină, schizochinen) și botromicină A2.
- Spectrometria de masă MALDI-TOF a evidențiat capacitatea tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S de a produce biomolecule cu proprietăți antifungice din cele trei clase de lipopeptide (surfactină, iturină și fengicină). În supernatantul culturii *Bacillus safensis* P1.5S au fost identificate doar surfactina și bacilibactina.
- Tulpina *B. velezensis* P3.3S a prezentat activitate antimicrobiană față de speciile fitopatogene utilizate: *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia*

sclerotiorum și *Verticillium dahliae*. Tulpina *B. safensis* P1.5S a inhibat doar dezvoltarea miceliului speciei *Rhizoctonia solani*.

- Tulpina *B. velezensis* P3.3S și-a menținut activitatea antimicrobiană în condiții de stres reprezentate de pH (5, 6, 7, 8), concentrații de NaCl (2,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 g/L) și concentrații de PEG₈₀₀₀ (8%, 12%, 15%, 17,7%, 20%).
- În genomul tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S s-au identificat numeroase gene implicate în formarea de biofilm, chemotaxie, motilitate, semnalizarea *quorum sensing* și producerea de substanțe polimerice extracelulare.
- S-a observat că tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S este atrasă de compușii testați (glucoză, acid fumaric, acid citric, maltoză, acid malic, fructoză și acid succinic), prezentând un răspuns chemotactic relativ ≥ 2 .
- Motilitatea tulpinii *Bacillus velezensis* P3.3S nu a fost afectată de factorii de stres utilizați.
- Tulpina *Bacillus velezensis* P3.3S a fost puternic aderentă și a format biofilm atât la un pH acid, cât și unul alcalin, precum și la diferite concentrații de NaCl și PEG.
- Arhitectura biofilmului s-a modificat în funcție de condițiile de cultivare. De exemplu, celulele bacteriene din biofilmele formate la 2,5 g/L NaCl și 8% PEG₈₀₀₀ sunt organizate sub formă de lanțuri care se împletesc într-o rețea complexă, conferind biofilmului un aspect spongios. Pe de altă parte, biofilmul format la 15% PEG₈₀₀₀ este format din celule bacteriene mici dispuse sub formă de lanțuri groase.
- Hidrofobicitatea suprafeței celulare a fost influențată în mod negativ de către factorii de stres precum salinitate și secetă.
- Condițiile de stres utilizate nu au influențat producerea de exopolizaharide în cazul tulpinii *B. velezensis* P3.3S.
- Analiza BLAST a genomului tulpinii *B. safensis* P1.5S a evidențiat prezența a numeroase gene implicate în conferirea toleranței la factorii de stres precum: temperaturi extreme, variații de pH, salinitate și secetă, dar și gene ce intervin în producerea de osmoliți și antioxidanți care asigură dezvoltarea optimă a bacteriilor în condiții de stres.
- Tulpina *Bacillus safensis* P1.5S a fost tolerantă la condițiile de stres abiotic testate: pH (5, 7 și 9), concentrații de NaCl (2,5, 10 și 15), respectiv valori de temperatură (20, 28 și 37°C).
- Tulpina *B. safensis* P1.5S a solubilizat fosfatul tricalcic indiferent de condiția de stres testată, sugerând toleranța acestei tulpini la temperatură, pH alcalin și salinitate (concentrații de NaCl).
- În genomul tulpinii *B. safensis* P1.5S s-au identificat gene implicate în producerea de acizi organici precum: gluconic, malic, formic, citric, lactic, acetic și succinic, dar și gene ce intervin în producerea de fosfataze.
- Investigarea în condiții de stres a unor mecanisme implicate în solubilizarea fosfatului tricalcic au arătat că în cazul tulpinii *B. safensis* P1.5S principalul mecanism a fost reprezentat de

producerea de acizi organici precum: tartric/gluconic, malic/formic, citric, lactic, acetic, succinic și unul necunoscut.

- Numărul acizilor organici, dar și concentrațiile acestora se modifică în funcție de condiția de stres investigată (pH, temperatură și salinitate), dar nu au influențat semnificativ eficacitatea tulpinii P1.5S de a solubiliza fosfații anorganici
- Fosfatazele acide și alcaline produse de către tulpina *Bacillus safensis* P1.5S nu intervin în solubilizarea fosfatului tricalcic în condiții de stres reprezentate de pH alcalin, temperatură și salinitate.
- Rezultatele obținute au demonstrat potențialul biotehnologic al celor două tulpini bacteriene studiate, sugerând aplicarea lor în agricultură ca biofertilizatori sau biopesticide. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a evalua pe deplin potențialul tulpinilor *B. safensis* P1.5S și *B. velezensis* P3.3S ca biofertilizatori, respectiv biopesticide. Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe investigarea efectului pe termen lung al factorilor de stres abiotici asupra viabilității și eficienței tulpinilor bacteriene, explorarea interacțiunilor acestora cu diverse populații microbiene din sol, evaluarea performanței tulpinilor în condiții de teren și evaluarea riscurilor de mediu asociate cu introducerea acestora în ecosistemele agricole.

DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE

Lista lucrărilor publicate

1. **Loredana-Elena Mantea**, Amada El-Sabeh, Marius Mihășan, Marius Ștefan (2025). *Bacillus safensis* P1.5S exhibits phosphorus-solubilizing activity under abiotic stress. *Horticulturae*, 11, 388. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11040388> (Q1, IF 3,1);
2. **Loredana-Elena Mantea**, Cristina-Veronica Moldovan, Mihaela Savu, Laura Gabriela Sârbu, Marius Ștefan, Mihail Lucian Bîrsă (2024). An eco-friendly method to synthesize potent antimicrobial tricyclic flavonoids. *Antibiotics*, 13(9), 798; <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090798> (Q1, IF 4,3);
3. Cristina-Veronica Moldovan, **Loredana-Elena Mantea**, Mihaela Savu, Peter G Jones, Laura Gabriela Sarbu, Marius Ștefan, Mihail Lucian Bîrsă (2024). Novel tricyclic flavonoids as promising anti-MRSA agents. *Pharmaceuticals*, 17(10), 1276; <https://doi.org/10.3390/ph17101276> (Q1, IF 4,3).

Contribuții în baze de date internaționale

1. Datele brute generate în urma secvențierii Illumina a genomurilor tulpinilor *Bacillus safensis* P1.5S și *Bacillus velezensis* P3.3S au fost încărcate în NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) sub numerele SRX20079035, respectiv SRX20032234.
2. Genomurile asamblate ale celor două tulpini au fost depuse în NCBI Genome cu următoarele numere de înregistrare:
 - *Bacillus safensis* P1.5S: ASM2993051v1 corelat cu GenBank assembly GCA_029930515.1 și RefSeq assembly GCF_029930515.1.
 - *Bacillus velezensis* P3.3S: ASM2988806v1 corelat cu GenBank assembly GCA_029888065.1 și RefSeq assembly GCF_029888065.1.

Lista abstractelor publicate

1. **Loredana-Elena Mantea**, Amada El-Sabeh, Theo Daboudet, Marius Mihășan, Francois Krier, Marius Ștefan (2023). Genomic and functional analysis of *Bacillus velezensis* P3.3S – a putative biocontrol agent of plant pathogens. *FEBS Open Bio* 13 (Suppl. S2) pag 44-45. DOI: 10.1002/2211-5463.13645 (IF 2,792).
2. **Loredana-Elena Mantea**, Ștefan Olaru, Marius Mihășan, Francois Krier, Marius Ștefan (2023). Biofilm formation under abiotic stress by *Bacillus velezensis* P3.3S – a plant growth promoting bacteria. *Journal of Experimental and Molecular Biology* 24(4):245 DOI: 10.47743/jemb-2023-24-4.

3. **Loredana-Elena Mantea**, Francois Krier, Marius Ștefan – The antimicrobial activity of P3.3S strain against *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizoctonia solani*. (2022). *Journal of Experimental and Molecular Biology* 23(2):59 DOI:10.47743/jemb-2022-23-2.
4. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Mihășan, Marius Ștefan (2021). Organic acids production by phosphate solubilizing bacteria. *Journal of Experimental and Molecular Biology* 22(2):52, DOI:10.47743/jemb-2021-5.
5. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Ștefan (2021). The influence of abiotic factors on phosphate solubilizing bacteria. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Biologia* 66(1):21-22 DOI:10.24193/subbbiol.2021.1.03.
6. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Ștefan (2021). The effect of pH and temperature on phosphate solubilization potential and growth of a bacterial strain isolated from maize rhizosphere. *Genetics and Applications* pag 68 ISSN 2566-431x.

Participări la conferințe internaționale

1. **Loredana-Elena Mantea**, Amada El-Sabeh, Theo Daboudet, Marius Mihășan, Francois Krier, Marius Ștefan. Genomic and functional analysis of *Bacillus velezensis* P3.3S – a putative biocontrol agent of plant pathogens. The 47th FEBS Congress 2023 – Together in bioscience for a better future. 8-12 iulie, Tours, Franța. Speed talk și Poster.
2. **Loredana-Elena Mantea**, Amada El-Sabeh, Marius Mihășan, Marius Ștefan. Genomic characterization of *Bacillus velezensis* P3.3S. RoBioinfo Conference 2023, 11-13 mai, București, România. Poster.
3. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Ștefan. Phosphate solubilizing bacteria ability to form biofilm under abiotic stress. International Union of Microbiological Societies (IUMS) Hybrid Congress 2022, 20-22 iulie, Rotterdam, Olanda/Online. Poster.
4. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Ștefan. The influence of abiotic factors on phosphate solubilizing bacteria. The 6th Young Researchers in BioSciences International Symposium 2021, 22-25 iulie, Cluj-Napoca, România. Comunicare orală.
5. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Ștefan. The effect of pH and temperature on phosphate solubilization potential and growth of a bacterial strain isolated from maize rhizosphere. The third International Green Biotechnology Congress 2021, 30 septembrie – 2 octombrie, Sarajevo, Bosnia și Herțegovina. Poster.

Participări la conferințe naționale

1. **Loredana-Elena Mantea**, Amada El-Sabeh, Marius Mihășan, Francois Krier, Marius Ștefan. *Bacillus velezensis* P3.3S – a putative bacterial biocontrol agent. Conferința Ecologia și protecția ecosistemelor, ediția a XIV – a, 2023, 2-4 noiembrie, Bacău, România. Poster

2. **Loredana-Elena Mantea**, Ștefan Olaru, Marius Mihășan, Francois Krier, Marius Ștefan. Biofilm formation under abiotic stress by *Bacillus velezensis* P3.3S – a plant growth promoting bacteria. 2023, Sesiunea științifică a Facultății de Biologie: Tendințe în Biologie: de la molecule la sisteme complexe. 2023, 27-28 octombrie, Iași, România. Poster.
3. **Loredana-Elena Mantea**, Francois Krier, Marius Ștefan – The antimicrobial activity of P3.3S strain against *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizoctonia solani*. Sesiunea Științifică a Facultății de Biologie: Tendințe în Biologie: de la molecule la sisteme complexe. 2022, 27-28 octombrie, Iași, România. Comunicare orală.
4. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Mihășan, Marius Ștefan. Organic acids production by phosphate solubilizing bacteria. Sesiunea Științifică a Facultății de Biologie: Tendințe în Biologie: de la molecule la sisteme complexe. 2021, 28-29 octombrie, Iași, România. Comunicare orală.
5. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Ștefan. Efectul pH-ului și temperaturii asupra bacteriilor solubilizatoare de fosfor. Sesiunea științifică anuală a studenților naturaliști, Ediția a V-a, Iași, 22 mai 2021. Comunicare orală.
6. **Loredana-Elena Mantea**, Marius Ștefan. Influența unor factori abiotici asupra capacității microorganismelor rizosferice de a solubiliza fosforul anorganic. Sesiunea științifică anuală a studenților naturaliști, Ediția a IV-a, Iași, 31 octombrie 2020. Comunicare orală.

Burse internaționale câștigate:

Bursă pentru tineri cercetători la cel de-al 47-lea Congres FEBS, 8-12 iulie 2023, Tours, Franța.

BIBLIOGRAFIE

1. Aarab, S., Ollero, J., Megias, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. (2019). Some characteristics of phosphate solubilizing rhizobacteria as an ecological strategy for sustainable agriculture. *Materials Today: Proceedings*, 13, 1224–1228.
2. Ahmad, H. M., Fiaz, S., Hafeez, S., Zahra, S., Shah, A. N., Gul, B., Aziz, O., Mahmood-Ur-Rahman, Fakhar, A., Rafique, M., Chen, Y., Yang, S. H., Wang, X. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria eliminate the effect of drought stress in plants: A review. In *Frontiers in Plant Science*, 13.
3. Ali, S., Glick, B. R. (2019). Plant–bacterial interactions in management of plant growth under abiotic stresses. In J. Singh (Ed.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 21–45). Elsevier.
4. Ansari, F. A., Ahmad, I. (2018). Biofilm development, plant growth promoting traits and rhizosphere colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: A promising PGPR. *Advances in Microbiology*, 08(03), 235–251.
5. Aroney, S. T. N., Poole, P. S., Sánchez-Cañizares, C. (2021). Rhizobial chemotaxis and motility systems at work in the soil. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–15.
6. Arora, N. K. (2019). Impact of climate change on agriculture production and its sustainable solutions. *Environmental Sustainability*, 2(2), 95–96.
7. Artenie, V., Ungureanu, E., Negură, A. M. (2008). *Metode de investigare a metabolismului glucidic și lipidic*. PIM Iași.
8. Awais, M., Tariq, M., Ali, A., Ali, Q., Khan, A., Tabassum, B., Nasir, I. A., Husnain, T. (2017). Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 312–321.
9. Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9.
10. Balestrini, R., Lumini, E., Borriello, R., Bianciotto, V. (2015). Plant-soil biota interactions. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (pp. 311–338). Elsevier.
11. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477.

12. Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97–110.
13. Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., Bedi, N. (2021). Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1045–1059.
14. Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., Weber, T. (2023). AntiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W46–W50.
15. Bridier, A., Meylheuc, T., Briandet, R. (2013). Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron*, 48, 65–69.
16. Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P. W., Trisos, C., Romero, J., Aldunce, P., Barrett, K., Blanco, G., Cheung, W. W. L., Connors, S., Denton, F., Diongue-Niang, A., Dodman, D., Garschagen, M., Geden, O., Hayward, B., Jones, C., ... Ha, M. (2023). *IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.*
17. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10.
18. Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8(1).
19. Chen, L., Liu, Y. (2024). The function of root exudates in the root colonization by beneficial soil rhizobacteria. *Biology*, 13(2).
20. Dong, X., Tu, C., Liu, Y., Zhang, R., Liu, Y. (2022). Identification of the core c-di-GMP turnover proteins responsible for root colonization of *Bacillus velezensis*. *IScience*, 25(11).
21. Fageria, N. K., Moreira, A. (2011). The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. *Advances in Agronomy*, 110.
22. FAO. (2017). The future of food and agriculture and challenges.
23. FAO, I. U. W. W. (2019). The state of food security and nutrition in the world : safeguarding against economic slowdowns and downturns. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

24. Fessia, A., Sartori, M., García, D., Fernández, L., Ponzio, R., Barros, G., Nesci, A. (2022). In vitro studies of biofilm-forming *Bacillus* strains, biocontrol agents isolated from the maize phyllosphere. *Biofilm*, 4.
25. Flissi, A., Ricart, E., Campart, C., Chevalier, M., Dufresne, Y., Michalik, J., Jacques, P., Flahaut, C., Lisacek, F., Leclère, V., Pupin, M. (2019). Norine: Update of the nonribosomal peptide resource. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D465–D469.
26. Gai, Y., Wang, H. (2024). Plant Disease: A Growing Threat to Global Food Security. In *Agronomy*, 14(8).
27. Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., Schumacher, J. (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-Protocol*, 9(9), 1–9.
28. Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131–140.
29. Gregory, G. J., Boyd, E. F. (2021). Stressed out: Bacterial response to high salinity using compatible solute biosynthesis and uptake systems, lessons from Vibrionaceae. In *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1014–1027.
30. Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., Mirza, M. S., Imran, A. (2021). Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 5).
31. Haque, M. M., Mosharaf, M. K., Khatun, M., Haque, M. A., Biswas, M. S., Islam, M. S., Islam, M. M., Shozib, H. B., Miah, M. M. U., Molla, A. H., Siddiquee, M. A. (2020). Biofilm producing rhizobacteria with multiple plant growth-promoting traits promote growth of tomato under water-deficit stress. *Frontiers in Microbiology*, 11.
32. Keren, G., Yehezkel, G., Satish, L., Adamov, Z., Barak, Z., Ben-Shabat, S., Kagan-Zur, V., Sitrit, Y. (2024). Root-secreted nucleosides: signaling chemoattractants of rhizosphere bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 15.
33. Khadraji, A., Mouradi, M., Bassour, H., Ghoulam, C. (2017). Phosphate solubilization capacity , salinity and drought tolerance of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L .). *Moroccan Journal of Chemistry*, 4(5), 722–729.
34. Kumar, A., Droby, S., Singh, V. K., Singh, S. K., White, J. F. (2020). Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. *Microbial Endophytes*, 1–33.
35. Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., Mishra, V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1–15.
36. Kumar, L., Chhogyel, N., Gopalakrishnan, T., Hasan, M. K., Jayasinghe, S. L., Kariyawasam, C. S., Kogo, B. K., Ratnayake, S. (2021). Climate change and future of agri-food production.

- In *Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges* (pp. 49–79). Elsevier.
37. Kundan, R., Pant, G., Jadon, N., Agrawal, P. K. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria: Mechanism and current prospective. *Journal of Fertilizers Pesticides*, 6(2), 1–9.
 38. Lata, R., Gond, S. K. (2019). Plant growth-promoting microbes for abiotic stress tolerance in plants. In *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology*. Elsevier Inc.
 39. Lavania, M., Nautiyal, C. S. (2013). Solubilization of tricalcium phosphate by temperature and salt tolerant *Serratia marcescens* NBRI1213 isolated from alkaline soils. *African Journal of Microbiology Research*, 7(34), 4403–4413.
 40. Lengai, G. M. W., Muthomi, J. W. (2018). Biopesticides and their role in sustainable agricultural production. *Journal of Biosciences and Medicines*, 06(06), 7–41.
 41. Liu, Y., Xu, Z., Chen, L., Xun, W., Shu, X., Chen, Y., Sun, X., Wang, Z., Ren, Y., Shen, Q., Zhang, R. (2024). Root colonization by beneficial rhizobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 48(1).
 42. Loudon, B. C., Haarmann, D., Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology Biology Education*, 12(1), 51–53.
 43. Mączik, M., Gryta, A., Frąc, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy*, 162, 31–87.
 44. Mallik, B., Chakravarti, B., Chakravarti, D. N. (2016). Principles of chromatography. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 13:6.1.1–6.1.23.
 45. Manzoor, M., Abbasi, M. K., Sultan, T. (2017). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology Journal*, 34(1), 81–95.
 46. Marchin, R. M., Ossola, A., Leishman, M. R., Ellsworth, D. S. (2020). A simple method for simulating drought effects on plants. *Frontiers in Plant Science*, 10.
 47. Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1).
 48. Mercado-Blanco, J., Thomashow, L., Romanazzi, G., Prieto, C. P., Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10(845).
 49. Mishra, P., Mishra, J., Arora, N. K. (2021). Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants – Recent developments and prospects: A review. *Microbiological Research*, 252.

50. Mishra, S., Huang, Y., Li, J., Wu, X., Zhou, Z., Lei, Q., Bhatt, P., Chen, S. (2022). Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. *Chemosphere*, 294, 133609.
51. Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. del C., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 242.
52. Mueller, C. W., Baumert, V., Carminati, A., Germon, A., Holz, M., Kögel-Knabner, I., Peth, S., Schlüter, S., Uteau, D., Vetterlein, D., Teixeira, P., Vidal, A. (2024). From rhizosphere to detritusphere – Soil structure formation driven by plant roots and the interactions with soil biota. *Soil Biology and Biochemistry*, 193.
53. Mukherjee, S., Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology* 17(6), 371–382.
54. Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M. A., Khan, N. (2018). Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology* 58(12), 1009–1022.
55. Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D. (2000). Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182(2), 291–296.
56. Nielsen, S. S. (2017). Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. In *Food Analysis Laboratory Manual*, 137–141.
57. Nievola, C. C., Carvalho, C. P., Carvalho, V., Rodrigues, E. (2017). Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature* 4(4), 371–405.
58. Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1–16.
59. Pandey, A., Tripathi, A., Srivastava, P., Choudhary, K. K., Dikshit, A. (2019). Plant growth-promoting microorganisms in sustainable agriculture. In A. Kumar, A. K. Singh, K. K. Choudhary (Eds.), *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology* (pp. 1–19). Elsevier.
60. Pang, J., Ryan, M. H., Lambers, H., Siddique, K. H. (2018). Phosphorus acquisition and utilisation in crop legumes under global change. *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 248–254.
61. Pantigoso, H. A., Manter, D. K., Fonte, S. J., Vivanco, J. M. (2023). Root exudate-derived compounds stimulate the phosphorus solubilizing ability of bacteria. *Scientific Reports*, 13(1), 1–12.
62. Pathogens, precipitation and produce prices. (2021). *Nature Climate Change* 11(8).

63. Prabhu, N., Borkar, S., Garg, S. (2019). Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. In S. Meena M. Naik (Eds.), *Advances in Biological Science Research - A Practical Approach* (pp. 161–176). Academic Press.
64. Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1), 63–77.
65. Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A. N., Yadav, N., Dhaliwal, H. S., Saxena, A. K. (2020). Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. In *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(8).
66. Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S. C. (2020). Phosphate-solubilizing microorganisms: Mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(1), 49–68.
67. Ray, D. K., West, P. C., Clark, M., Gerber, J. S., Prishchepov, A. V., Chatterjee, S. (2019). Climate change has likely already affected global food production. *PLoS ONE*, 14(5).
68. Richardson, A. E., Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*, 156(3), 989–996.
69. Rizzo, D. M., Lichtveld, M., Mazet, J. A. K., Togami, E., Miller, S. A. (2021). Plant health and its effects on food safety and security in a One Health framework: four case studies. *One Health Outlook*, 3(1).
70. Robert L. Tate. (2021). The soil ecosystem: Biological participants. *Soil Microbiology* (Third Edit). John Wiley Sons.
71. Sarikhani, M. R., Khoshru, B., Greiner, R. (2019). Isolation and identification of temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria as a potential microbial fertilizer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(8), 1–10.
72. Scervino, J. M., Mesa, M. P., della Mónica, I., Recchi, M., Moreno, N. S., Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils*, 46(7), 755–763.
73. Shahid, M., Singh, U. B., Khan, M. S., Singh, P., Kumar, R., Singh, R. N., Kumar, A., Singh, H. V. (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in Microbiology* 14.
74. Shariati, V. J., Malboobi, M. A., Tabrizi, Z., Tavakol, E., Owilia, P., Safari, M. (2017). Comprehensive genomic analysis of a plant growth-promoting rhizobacterium *Pantoea agglomerans* strain P5. *Scientific Reports*, 7(1).

75. Sharma, M., Saleh, D., Charron, J. B., Jabaji, S. (2020). A crosstalk between *Brachypodium* root exudates, organic acids, and *Bacillus velezensis* B26, a growth promoting bacterium. *Frontiers in Microbiology*, 11.
76. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(587), 1–14.
77. Silva, U. C., Cuadros-Orellana, S., Silva, D. R. C., Freitas-Júnior, L. F., Fernandes, A. C., Leite, L. R., Oliveira, C. A., Dos Santos, V. L. (2021). Genomic and phenotypic insights into the potential of rock phosphate solubilizing bacteria to promote millet growth *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*, 11.
78. Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., Trivedi, P. (2023). Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. In *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research.
79. Singh, D., Ghosh, P., Kumar, J., Kumar, A. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs): Functions and benefits. *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 2: Rhizosphere, Microbiome and Agro-Ecology*, 205–227.
80. Singh, D., Singh, C. K., Singh, Y. P., Singh, V., Singh, R., Tomar, R. S. S., Sanwal, S. K., Karwa, S., Mishra, V. K., Sarkar, S. K., Pal, M., Kumar, A., Yadav, R. K., Sharma, P. C. (2018). Evaluation of cultivated and wild genotypes of *Lens* species under alkalinity stress and their molecular collocation using microsatellite markers. *PLoS ONE*, 13(8).
81. Singh, M. P., Singh, P., Li, H. B., Song, Q. Q., Singh, R. K. (2019). Microbial biofilms: Development, structure, and their social assemblage for beneficial applications. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms Current Research and Future Trends in Microbial Biofilms* (pp. 125–138). Elsevier.
82. Sun, X., Xu, Z., Xie, J., Hesselberg-Thomsen, V., Tan, T., Zheng, D., Strube, M. L., Dragoš, A., Shen, Q., Zhang, R., Kovács, Á. T. (2022). *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions. *ISME Journal*, 16(3), 774–787.
83. Tatusova, T., Dicuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6614–6624.
84. Tecon, R., Or, D. (2016). Bacterial flagellar motility on hydrated rough surfaces controlled by aqueous film thickness and connectedness. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
85. United Nations. (2015). *Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development*.
86. United Nations. (2019). *World Population Prospects 2019: Highlights*.

87. Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 184.
88. Wan, W., Qin, Y., Wu, H., Zuo, W., He, H., Tan, J., Wang, Y., He, D. (2020). Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil. *Frontiers in Microbiology*, 11.
89. Wang, Y. Y., Li, P. S., Zhang, B. X., Wang, Y. P., Meng, J., Gao, Y. F., He, X. M., Hu, X. M. (2020). Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. *BioResources*, 15(2), 2560–2578.
90. Waraich, E. A., Ahmad, R., Halim, A., Aziz, T. (2012). Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12(2).
91. Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., Fan, Y., Wei, Z. (2018). Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*, 247(August 2017), 190–199.
92. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6).
93. Xu, Q., Ali, S., Afzal, M., Nizami, A. S., Han, S., Dar, M. A., Zhu, D. (2024). Advancements in bacterial chemotaxis: Utilizing the navigational intelligence of bacteria and its practical applications. *Science of The Total Environment*, 931, 172967.
94. Yadav, A., Verma, P., Singh, B., Chauahan, V. S., Suman, A., Saxena, A. K. (2017). Plant growth promoting bacteria: Biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. *Advances in Biotechnology Microbiology*, 5(5), 1–17.
95. Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(4), 316–323.
96. Yang, P., van Elsland, J. D. (2018). Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil. In *Applied Soil Ecology* (Vol. 129, pp. 112–120). Elsevier B.V.
97. Yasmeen, T., Ahmad, A., Arif, M. S., Mubin, M., Rehman, K., Shahzad, S. M., Iqbal, S., Rizwan, M., Ali, S., Alyemeni, M. N., Wijaya, L. (2020). Biofilm forming rhizobacteria enhance growth and salt tolerance in sunflower plants by stimulating antioxidant enzymes activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 242–256.
98. Zaidi, A., Khan, M. S., Ahmad, E. (2014). Microphos: Principles, production and application strategies. In M. Khan, A. Zaidi, J. Musarrat (Eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms*:

Principles and Application of Microphos Technology (pp. 1–30). Springer International Publishing.

99. Zhang, J., Wang, P., Fang, L., Zhang, Q. A., Yan, C., Chen, J. (2017). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. *Polish Journal of Microbiology*, 66(1), 57–65.
100. Zhao, J., Xie, X., Jiang, Y., Li, J., Fu, Q., Qiu, Y., Fu, X., Yao, Z., Dai, Z., Qiu, Y., Chen, H. (2024). Effects of simulated warming on soil microbial community diversity and composition across diverse ecosystems. *Science of The Total Environment*, 911, 168793.
101. Zhou, X., Tahvanainen, T., Malard, L., Chen, L., Pérez-Pérez, J., Berninger, F. (2024). Global analysis of soil bacterial genera and diversity in response to pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 198, 109552.
- Zuluaga, M. Y. A., de Oliveira, A. L. M., Valentinuzzi, F., Jayme, N. S., Monterisi, S., Fattorini, R., Cesco, S., Pii, Y. (2023). An insight into the role of the organic acids produced by *Enterobacter* sp. strain 15S in solubilizing tricalcium phosphate: in situ study on cucumber. *BMC Microbiology*, 23(1).