



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00143**

(22) Data de depozit: **16.02.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2013** BOPI nr. **4/2013**

(41) Data publicării cererii:  
**30.08.2010** BOPI nr. **8/2010**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-  
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA  
PLANTELOR,**  
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:  
• **CONSTANTINESCU FLORICA,**  
*STR.EMANOIL PORUMBARU NR.67,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*  
• **OANCEA FLORIN,** *STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**US 2008/0152684 A1; US 7211428 B1**

(54) **TULPINĂ DE *BACILLUS SUBTILIS* UTILIZABILĂ CA  
BIOINOCULANT**



# RO 125650 B1

1           Invenția se referă la o nouă tulpină de *Bacillus subtilis*, destinată utilizării ca bio-  
inoculant pentru tratamentul semințelor și/sau al solului, care a fost obținută prin selecția, în  
3           trepte, a unor izolate naturale din rizosfera de grâu, fără utilizarea agenților mutageni.

          Sunt cunoscute mai multe tulpini de *Bacillus subtilis*, care sunt destinate utilizării ca  
5           bioinoculant. **US 2008/0152684 A1** prezintă o tulpină de *B. subtilis* WG6-14 (număr de de-  
pozit NRRL B-30954) și o compoziție pe baza acestei tulpini. **US 7211428 B1** descrie o tul-  
7           pină de *B. subtilis* (număr de depozit MTTC 5130) cu caracteristici superioare de protecție  
a plantelor împotriva ciupercilor patogene. **WO 2007/043771 A1** se referă la compoziții pen-  
9           tru prevenirea bolilor plantelor pe baza tulpinilor KCCM 10639 sau KCCM 10640 de *B. subtilis*  
și la un procedeu de aplicare a acestor compoziții. **US 6291426 B1** și **US 6417163 B1** prote-  
11          jează tulpina AQ/QST 713 de *B. subtilis* (cu număr de depozit NRRL BO-21661), care este  
înalț producătoare de antibiotice și cu un spectru larg de activitate insecticidă, antifungică  
13          și antibacteriană.

          Nu s-au descris însă până acum tulpini de *B. subtilis* care să prezinte concomitent  
15          un spectru larg de acțiune antifungică, capacitate de stimulare a creșterii plantelor și  
activitate de favorizare a nodulării rădăcinilor de leguminoase.

          Problema pe care urmărește să o rezolve invenția de față este combaterea atacului  
17          ciupercilor fitopatogene de sol, fără impact negativ asupra mediului.

          Tulpina *B. subtilis* B49b (număr de depozit NCAIM (P) B001360) prezintă un spectru  
19          larg de acțiune antifungică față de ciupercile de sol fitopatogene (*Rhizoctonia solani*, *Pythium*  
*ultimum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici* *Sclerotinia*  
21          *sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola*) și o activitate de stimulare a creșterii plantelor și de  
favorizare a nodulării rădăcinilor de leguminoase, datorită producerii de auxine.  
23          

          Tulpina *B. subtilis* B49b prezintă următoarele avantaje:

25          - creștere bogată pe mediile uzuale utilizate pentru creșterea bacililor gram pozitivi  
sporulați;

27          - capacitate de a modula formarea consorțiilor microbiene de consens cu alte bacterii  
utilizate ca bioinoculanți, datorită activității lactonizace prin care influențează semnalele AHL,  
29          implicate în realizarea sensibilității de grup;

          - spectru larg de acțiune împotriva atacului ciupercilor fitopatogene de sol;

31          - stimularea creșterii plantelor și favorizarea nodulării datorită producerii *in situ* de  
fitohormoni.

33          În continuare, invenția va fi descrisă în detaliu, cu referire și la figura care arată  
spectrul de detecție prin lichid-cromatografie de înaltă presiune al lipopeptidelor antibiotice  
35          din extractul metanolic al culturii de *B. subtilis* B49b.

          Figura prezintă spectrul de detecție (absorbție la 206 nm) prin lichid-cromatografie  
37          de înaltă presiune (HPLC) al lipopeptidelor antibiotice din extractul metanolic al culturii de  
*Bacillus subtilis* B49b (C), comparativ cu substanțele etalon standard (produse Sigma  
39          dizolvate în metanol la o concentrație finală de 500 mg/l) iturin (A) și surfactin (B). Sunt  
indicate picurile corespunzătoare iturinului (Itu) și surfactinului (Sf).

41          **Exemplu.** Tulpina B49b de *Bacillus subtilis* a fost obținută la Institutul de Cercetare-  
Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, din sol cultivat cu grâu (din rizosfera de  
43          grâu). Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 200 izolate de bacili  
sporulanți gram-pozitivi, pe baza acțiunii benefice exercitate asupra diferitelor plante de  
45          cultură (tomate, castraveți, floarea-soarelui), datorită acțiunii de protecție față de ciupercile  
fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium*  
47          *oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici* *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola*) și  
producerii *in situ* de fitohormoni.

# RO 125650 B1

În vederea încadrării taxonomice, tulpina B49b a fost caracterizată din punct de vedere morfologic (tabelul 1), biochimic - fiziologic (tabelul 2) și pe baza secvenței 16S rADN.

Tabelul 1

Morfologia coloniilor de *Bacillus subtilis* B49b pe diferite medii, după cultivare timp de 24 h

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii B49b		
		Culoare	Aspect exterior	Dimensiuni (24h)
Medii gelificate semi-sintetice	Mediu cu decoct de cartof-glucoză -agar (CGA)	Brun	Rugoase, margini neregulate sub formă de filamente	colonii mari
	Mediu cu extract de carne (beef extract)	Crem	Rugoase, centrul proeminent, încrețit, margini neregulate	colonii mari
	Mediu cu decoct de fasole	Crem-brun	Rugoase, margini neregulate	colonii medii
	Mediu cu extract de sol	Crem-Brun	Rugoase, margini neregulate	colonii medii
Medii solide naturale	Felii de cartof sterile	Brun	Rugoase, margini neregulate, centru cu rugozități fine	colonii mari
Medii lichide	Mediu cu decoct de cartof-glucoză	-	Peliculă fină la suprafață, rugoasă, turbiditate slabă	-
	Mediu cu extract de carne	-	Peliculă fină la suprafață, rugoasă, turbiditate slabă	-

Tabelul 2

Caracteristicile fiziologice ale tulpinii B49b

Testul biochimic	B49b
Reacția Gram	+
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Reducerea NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	+
Creștere anaerobă	-
Catalaza	49

# RO 125650 B1

Tabelul 2 (continuare)

Testul biochimic	B49b
Sursa de carbon:	
malonat	+
citrat	+
propionat	-
tartrat	+
trehaloza	+
glucoza	+
Acidifica:	
xiloza	+
glucoza	+
arabinoza	±
manitol	+
rafinoza	+
celobioza	+
Toleranță la NaCl 7%	+

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin amplificarea PCR utilizând primerii 27fm (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') și r1522 (5-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') (Weisberg et al, 1991). Producții de amplificare enzimatică au fost separate în gel agarizat 1%, iar fragmentul 16S rADN a fost extras din gel și purificat cu chitul QIAGEN (QIAGEN Benelux BV, Venlo, Olanda). Secvențierea a fost efectuată la ServiceXS (Leiden, Olanda), fiind urmată de procesarea cu programul Vector NTI 10 (Invitrogen, SUA). Pentru identificarea taxonomică pe baza secvențelor, s-au realizat cercetări referitoare la similaritatea secvențelor în Genbank, utilizând softul NCBI Taxonomy BLAST. Secvențele rezultate au fost depuse la GenBank. Încadrarea taxonomică a tulpinii B49b s-a bazat pe o similaritate de cel puțin 98% între secvența 16S rADN a acestei tulpini cu cele ale altor tulpini a căror încadrare taxonomică este recunoscută. Secvențele 16S rADN pentru tulpina B49b, depuse la GenBank, au numărul de acces EU334511.

Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii B49b a fost efectuată pe mediul cu cartof dextroză agar (CGA - PDA). Tulpina B49b (dintr-o cultură de 24 ore) a fost însământată pe mediu prin strierea cu ansa a unei linii drepte o distanță de 3 cm de o rondea calibrată de miceliu (5 mm) din cele șapte ciuperci studiate. Plăcile Petri astfel însământate au fost incubate la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 24, 48 și 72 h. Experiența a fost repetată de trei ori.

Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Bacillus subtilis* B49b asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm)

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina B49b
<i>Rhizoctonia solani</i>	8
<i>Pythium ultimum</i>	6
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>graminearum</i>	6
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	8
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	7
<i>Sclerotium bataticola</i>	4
<i>Trichoderma viride</i>	9

Rezultatele au demonstrat că tulpina B49b produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciuperca *T. viride* (9 mm) aceasta fiind urmată de *R. solani* și *F. oxisporum* f. sp. *radicis lycopersici* (8 mm), *S. sclerotiorum* (7 mm), *P. ultimum* și *F. oxisporum* f. sp. *graminearum* (6 mm).

Tulpina B49b a fost testată în condiții de seră în ceea ce privește eficacitatea în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxisporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*), care apar frecvent în stadiul de plantulă/răsad și produc pagube, fie datorită pierderilor de material săditor (răsaduri), fie datorită reducerii producției.

Operațiunile implicate au constat în pregătirea inoculului bacterian prin înmprospătarea în eprubete (incubate la 27°C, timp de 2...3 zile) pe mediul cartof-glucoză-agar (CGA) și realizarea suspensiilor bacteriene în tampon fosfat cu titrul de 10<sup>8</sup> ufc/ml. Inoculul fungic s-a obținut în plăci Roux, pe mediul natural alcătuit din boabe de ovăz dublu sterilizate la 1 atm timp de 20 min, prin inocularea cu miceliu și incubarea la 27°C, timp de 3...4 zile.

Substratul utilizat în seră a constat din 1/2 pământ de grădină + 1/4 mraniță + 1/4 nisip. Acesta a fost amestecat uniform cu inoculul fungic (- 2 x 10<sup>6</sup> spori/ kg sol) și apoi distribuit în tăvi din plastic (32/24 cm) cu 48 h înainte de semănat.

Materialul vegetal, respectiv, semințele de floarea soarelui (Festiv), tomate (Unirea) și castravete (Comichon), au fost tratate înainte de semănat prin imersie, timp de 20 min, în suspensiile bacteriene al căror titru a fost stabilit la 10<sup>8</sup> ufc/ml.

În primul experiment, au fost testate, împreună cu B49b, alte 6 tulpini de *B. subtilis* și anume: Bs 23, Bs 27, Bs 30, Bs 36, Bs 45, Bs 48. Inocul fungic aplicat a constat în complexul *R. solani* + *F. oxysporum* f. sp. *graminearum* + *P. de baryanum* (RFP), *S. sclerotiorum* și *S. bataticola*. Au fost utilizate semințe de floarea soarelui (Festiv) și castravete (Comichon).

Experimentul a fost analizat după 3 săptămâni de la semănat, în ceea ce privește eficacitatea tulpinilor în combaterea ciupercilor fitopatogene. De asemenea, s-a analizat efectul de stimulare a creșterii plantelor, prin măsurarea lungimii rădăcinii, a tulpinii și lungimea totală a plantelor.

# RO 125650 B1

- 1                   Calculul analizei variantei s-a efectuat cu programul ANOVA.
- 3                   Analiza variantei pentru cei trei parametri luați în considerare, lungimea rădăcinii, a  
tulpinii și lungimea totală a plantelor, pentru cele două culturi, floarea soarelui și castravete  
a evidențiat următoarele:
- 5                   La cultura de floarea-soarelui, lungimea rădăcinii a fost influențată de factorul A  
(inoculul fungic) independent de factorul B - inoculul bacterian (tabelul 4). Complexul fungic  
7                   R.F.P (*Rhizoctonia-Fusarium-Pythium*) a înregistrat cele mai mari valori, asigurate statistic  
față de celelalte două ciuperci studiate, care au exercitat un efect egal.

# RO 125650 B1

Tabelul 4

Lungimea rădăcinii (mm) plantelor de floarea-soarelui (cv. Festiv) sub influența tratamentelor biologice cu diferite izolate de *B. subtilis* la sămânță și cu inoculanți fungici, aplicați în sol

Factor A (inocul fungic)	Tiradin 70 PU (4g/kg)	Martor nebact., inoculat	Bs23	Bs27	Bs30	Bs36	Bs5	Bs48	B49b	Medii factor A
R-F-P	59,05bcd	27,77i	68,68b	59,57bcd	94,82a	65,27bc	39,40ghi	55,87b-f	98,75a	63,25a
Ss	49,03c-g	27,85i	40,31f-i	37,61 ghi	60,83bc	30,96hi	59,76bcd	36,67ghi	69,88b	45,78b
Sb	51,02c-g	27,33i	40,35f-i	32,44hi	41,79e-i	26,51i	56,78b-e	44,6d-h	49,9c-g	41,19b
Medii factor B	53,04b	27,65e	49,781bc	43,208bc	55,817a	40,917cd	52,01b	45,70bc	72,86a	

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru  $P < 0,05$  (DS A5% = 5,306 DS B5% = 10,202 DSAB5% = 15,919)

# RO 125650 B1

1 Studiul interacțiunii tratamentelor biologice asupra rădăcinilor plantelor de floarea-  
soarelui, au relevat următoarele: (i) în cazul utilizării complexului R.F.P. ca inocul de patogeni  
3 la sol tulpinile B49b și Bs30 au determinat cele mai mari creșteri ale rădăcinilor plantelor  
(asigurate statistic față de martorul netratat) urmate de izolatele de *B. subtilis* Bs23, Bs36,  
5 Bs27, Bs48 și Bs45; (ii) la variantele în care solul s-a inoculat cu ciuperca *S. sclerotiorum*,  
cele mai mari creșteri vegetative ale rădăcinilor s-au înregistrat când semințele au fost  
7 bacterizate cu tulpinile de *B. subtilis* B49b, Bs30.

9 Inoculul fungic, independent de cel bacterian, a influențat cel mai semnificativ  
dezvoltarea plantelor de floarea soarelui, respectiv, lungimea totală a acestora, în cazul  
complexului fungic *Rhizoctonia-Fusarium-Pythium*.

# RO 125650 B1

Tabelul 5

1

*Lungimea totală a plantelor de floarea-soarelui (mm) sub influența tratamentelor biologice cu inoculanți bacterieni la sămânță și fungici, aplicați în sol*

3

Factor A (inocul fungic)	Tiradin 70 PU (4 g/kg)	Martor nebact. Inoculat	Bs23	Bs27	Bs30	Bs36	Bs45	Bs48	B49b	Medii factor A
R-F-P	136,11d-f	73,11 lm	150,39cd	134,68de1	186,53a	129,35efg	104,15ij	117,23g-j	170,61 ab	133,57a
Ss	115,66g-j	65,23m	124,66fgh	123,36fgh	127,74efg	113,71g-j	133,86def	128,29efg	143,88cde	119,60b
Sb	127,23e-h	78,22lm	118,80f-j	100,24jk	144,51cde	105,88ij	121,38f-i	113,83g-j	155,80bc	118,43b
Medii factor B	126,34bc	72,19d	131,28b	119,42bc	152,92a	116,32c	119,80bc	119,78bc	156,76a	

5

7

9

11

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru  $P < 0,05$  (DS A5% = 6,263 DS B5% = 12,041 DS AB5% = 18,789)

# RO 125650 B1

1 Izolatele de *B. subtilis*, independent de ciupercile de sol experimentate, au determinat  
 3 cele mai mari creșteri ale lungimii totale a plantelor, asigurate statistic față de matorul  
 netratat, în variantele bacterizate cu izolatele *B. subtilis* B49b și Bs30, acestea având valori  
 distinct semnificative față de tulpinile Bs23, Bs27, Bs45, Bs48 și Bs36.

5 Interacțiunea celor două tipuri de inocul biologic a demonstrat faptul că tulpinile B49b  
 și Bs30 au favorizat distinct semnificativ creșterea totală a plantelor de floarea-soarelui  
 7 comparativ cu matorul netratat și cu varianta tratată chimic, pentru toate tipurile de inocul  
 fungic.

9 Calculul eficacității (%) tratamentelor cu *B. subtilis* la sămânța de floarea-soarelui (cv.  
 Festiv), în prevenirea atacului ciupercilor de sol luate în studiu, a reflectat următoarele  
 11 (tabelul 6):

- în variantele infectate cu complexul R.F.P. cea mai mare eficacitate (> 50%) s-a  
 13 obținut în cazul bacterizării semințelor cu tulpinile B49b, Bs30, Bs23 și Bs27;

- în variantele infectate cu *S. sclerotiorum* și *S. bataticola*, eficacitatea maximă s-a  
 15 obținut în varianta tratată cu tulpina B49b (100%);

- tratamentele chimice cu Tiradin 70 PU (4 g/kg semințe) au avut valori ale eficacității  
 17 situate între 64-100%, cea mai mică eficacitate înregistrându-se în variantele cu solul infectat  
 cu complexul R.F.P., iar cea mai mare în solul infectat cu *S. bataticola* și *S. sclerotiorum*;

19 - tulpina B49b a avut o eficacitate de combatere a atacului ciupercilor fitopatogene  
 de sol superioară matorului etalon chimic.

Tabelul 6

23 *Eficacitatea diferitelor tulpini de B. subtilis în prevenirea atacului unor ciuperci telurice la  
 cultura florii soarelui (Festiv) în condiții de seră*

Inocul fungic*	R.F.P.*		S. s.		S.b.	
	% plante sănătoase răsărite	Eficaci- tatea(%)	% plante sănătoase răsărite	Eficaci- tatea(%)	% plante sănătoase răsărite	Eficaci- tatea(%)
Bs 23	83	64	90	78	80	60
Bs 27	80	57	83	62	79	58
Bs 30	89	77	97	93	99	98
Bs 36	73	43	81	58	77	54
Bs 45	75	47	85	67	80	60
Bs 48	71	38	81	58	98	56
B49b	95	89	100	100	100	100
Tiradin 70 PU (4g/kg)	83	64	100	100	100	100
Mt. Netratat	53	-	55	-	50	-

\* RFP = *R. solani* + *F. oxysporum* + *P. de baryanum*; S.s. = *S. sclerotiorum*; S.s. = *S. bataticola*.

## RO 125650 B1

Lungimea totală a plantelor de castraveți (tabelul 7) a fost influențată de tratamentele biologice cu inoculanții fungici, valori distinct semnificative, asigurate statistic față de martorul netratat, rezultând în varianta inoculată cu <i>S. bataticola</i> .	1 3
Tratamentele bacteriene, independent de cele cu patogeni fungici, au influențat pozitiv lungimea totală a plantelor în cazul utilizării tulpinilor B49b și Bs30, care au avut valori distinct semnificative comparativ martorul netratat.	5
Interacțiunea celor două tipuri de inoculanți, bacterian și fungic, a relevat faptul că față de martorul netratat și varianta tratată chimic, tulpina B49b a determinat creșteri distinct semnificative ale lungimii totale a plantelor de castraveți.	7 9

# RO 125650 B1

Tabelul 7

Lungimea totală a plantelor de castraveți (Cornichon) sub influența inoculului bacterian aplicat la semințe (factor B) și a celui fungic (factor A) aplicat în sol

Factor A (inocul fungic)	Tiradin 70 PU (4 g/kg)	Martor nebact. inoculat	Bs23	Bs27	Bs30	Bs36	Bs45	Bs48	B49b	Medii factor A
R-F-P	100,34d-f	43,33lm	78,11h-k	77,77h-k	123,59ab	95,74e-g	88,55e-i	89,44e-i	112,38bcd	89,921b
Ss	110,20bc	35,82m	97,06e-g	87,33f-j	119,00abc	81,26g-i	104,11cde	73,83ijk	115,40bcd	91,56ab
Sb	88,626e-j	38,92m	65,08j-l	93,030e-h	125,85ab	101,10d-f	104,167cde	114,627bcd	132,382a	95,97a
Medii factor B	99,725b	39,35e	80,08d	86,04cd	122,81a	92,70bc	98,94b	92,63bc	120,05a	

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru  $P < 0,05$  (DS A5% = 5,413; DS B5% = 10,408; DS AB5% = 16,241)

Eficacitatea tulpinilor de *B. subtilis* în combaterea unor ciuperci telurice la cultura de castraveți (Cornichon)

Inocul fungic*	R.F.P.		S. s.		S.b.	
	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea(%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea(%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea(%)
Bs 23	60	27	87	74	80	57
Bs 27	58	24	70	40	87	72
Bs 30	98	96	100	100	90	79
Bs 36	72	49	78	56	73	43
Bs 45	74	53	79	58	79	55
Bs 48	79	62	82	64	85	68
B49b	95	89	98	96	88	74
Tiradin 70 PU (4g/kg)	93	87	98	96	90	79
Mt. Netratat	45	-	50	-	53	

\* RFP = *R. solani* + *F. oxysporum* + *P. de baryanum*; S.s. = *S. sclerotiorum*; S.s. = *S. bataticola*.

Calculul eficacității (% - tabelul 8) al tratamentelor cu *B. subtilis* la sămânța de castraveți (Cornichon), a reflectat următoarele:

- în variantele infectate cu complexul R.F.P. și cu *S. sclerotiorum* cea mai mare eficacitate (> 80%) s-a înregistrat în variantele tratate cu tulpinile B49b și Bs30;

- în variantele infectate cu *S. bataticola*, cea mai mare eficacitate a rezultat în cazul utilizării tulpinilor Bs30 (79%) și Bs49b (74%);

- tratamentul semințelor cu B49b a determinat obținerea unei eficacități mai mari (89%) în varianta infectată cu complexul ciupercilor fitopatogene de sol R.F.P. decât cea obținută în varianta tratată cu Tiradin (87%).

În cadrul unei alte serii de experimente semințele de tomate, varietatea Carmello (Syngenta, Enkhuizen, Olanda) au fost inoculate cu B49b prin imersie într-un amestec de 1% (w/v) metilceluloză (Sigma, St Louis, SUA) și  $1 \times 10^9$  ufc/ml bacterii suspendate în tampon fosfat. Pentru a compara activitatea de combatere biologică a tulpinii B49b față de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), alte 3 tulpini de *B. subtilis*, Bc1c, B30, Bsal și 2 tulpini de *Pseudomonas*, *P. fluorescens* WCS 365 (tulpină recunoscută în literatură ca având calități de combatere biologică și ca un excelent colonizator al rizosferei) și *P. chlororaphis* PCL 1391 (excelent colonizator al rizosferei, produce fenazina-1-carboximida). Tulpinile de *Pseudomonas* au fost considerate martori pozitivi.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (tulpina ZUM 2407) a fost crescută pe mediul cu cartof-dextroză agar (PDA, Difco) pentru a obține o creștere uniformă a miceliului.

# RO 125650 B1

1 După o incubare de 4-5 zile la 28°C, miceliul mărunțit a fost utilizat pentru inocularea a  
200 ml mediu Czapek-Dox (CDA, Difco Laboratories, Detroit, SUA) suplimentat cu  
3 kanamicină (Duchefa, Haarlem, Olanda) și tetraciclină (Duchefa, Haarlem, Olanda) la  
concentrații finale de 50 și, respectiv, de 40 μg/ml. Baloanele Erlenmayer astfel inoculate au  
5 fost incubate la 28°C, pentru 4...5 zile. Sporii au fost separate de miceliu prin filtrare, utilizând  
o pânză sterilă (Omnilabo International BV, Breda, Olanda).

7 Semințele de tomate bacterizate au fost semănate în sol nesteril (Jonkind grond B.V.,  
Aalsmeer, Olanda) infectat cu spori de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* în  
9 concentrație de  $2 \times 10^6$  spori/ kg sol. Fiecare tratament a constat în 96 plante distribuite câte  
12 în 8 tăvițe de creștere. Condițiile din seră au fost de 21...24°C și 70% umiditate relativă.

11 După 4 săptămâni, plantele au fost scoase din sol, spălate cu apă și rădăcinile au fost  
analizate în ceea ce privește simptomele caracteristice, respectiv, leziuni maronii sau porțiuni  
13 putrezite.

15 Rădăcinile care nu au prezentat niciun simptom caracteristic bolii au fost considerate  
sănătoase. Datele au fost analizate din punct de vedere statistic cu ANOVA și compararea  
mediilor s-a efectuat cu testul Fisher's ( $\alpha = 0,05$ ), utilizând softul SPSS (SPSS, Chicago,  
17 SUA).

19 Rezultatele au demonstrat ca toate tulpinile de *Bacillus* analizate au protejat  
semnificativ plantele de tomate față de infecția cu *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*,  
comparativ cu martorul netratat, dar cel mai redus grad de atac s-a înregistrat  
21 în varianta tratată cu tulpina de *B. subtilis* B49b (48% - tabelul 9).

23 Eficacitatea tulpinii B49 a fost la nivelul celor doi martori pozitivi (tulpini etalon),  
recunoscute în literatură ca având caracteristici foarte bune de combatere a atacului de  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Experimentele efectuate în condiții de sera au  
25 fost repetate de cel puțin 5 ori, iar rezultatele au reflectat ca tulpina B49b a determinat de  
fiecare data reduceri distinct semnificative ale gradului de atac comparativ cu martorul  
27 negativ.

Tabelul 9

29 *Testarea in vivo a capacității de protecție exercitată de tulpini de Bacillus subtilis și două  
tulpini de Pseudomonas față de Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*

Varianta	Procentul plantelor infectate la 4 săptămâni de la însămânțat
B49b	48,16
PCL1391	44,6
sal 2	55,74
WCS365	59,43
C1C	58,44
B30	57,97
Martor FORL	74,30

39 În vederea extracției metaboliților antifungici a fost selectat mediul cel mai favorabil  
41 pentru producerea acestora și anume mediul Landy (Akpa et al., 2001) și mediul optimizat  
pentru producerea de antibiotice (Jacques, 1999). De asemenea s-au selectat solvenții pentru  
43 extracție și anume etilacetat + 1% acid formic, care au permis obținerea unui extract brut cu  
cea mai mare acțiune antagonistă față de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

# RO 125650 B1

Baloane Erlenmayer (250 ml) cu 25 ml mediu Landy au fost inoculate cu B49b și incubate la 28°C, cu agitare la 150 rpm timp de 72 h. Supernatantul a fost amestecat în proporție de 1:1 cu solventul și incubat la 28°C și agitat la 150 rpm/min timp de 8 h, după care a urmat extracția propriu-zisă prin centrifugare la 4000 rpm/min și 4°C timp de 20 min.	1 3
Faza organică a fost colectată și concentrată pe un evaporator rotativ în vid până la uscare.	5
În vederea separării și identificării fracțiunilor active din extractul brut, plăci cromatografice din aluminiu cu silicagel (HPTLC 20x20 cm silicagel60 F254s, Merck) au fost revelate în sistemul de solvenți cloroform - metanol - apă (65:25:4 v/v/v). Din extractul brut au fost aplicați 10 μl per spot, iar frontul de migrare s-a limitat la 7 cm. Plăcile au fost vizualizate în lumina UV la 254 nm și s-au notat factorii de retenție.	7 9 11
Pentru identificarea spoturilor active față de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> (Forl), s-a făcut testul bioautografic, care a constatat în acoperirea cu 1% mediu cu cartof dextroză agar (PDA), inoculat cu spori de Forl în concentrație de $2 \times 10^6$ spori/ml și incubare la 28°C pentru 72-96 ore.	13 15
Pentru identificarea compușilor antifungici, extractul brut și fracțiunile active din plăcile bioautografice au fost analizate prin cromatografie lichidă de înaltă presiune. Extractul brut uscat obținut din 25 ml cultură a fost resuspendat în 50 μl metanol și purificat prin centrifugare în tuburi spinX cu filtru al căror pori aveau dimensiunea de 0,45 μl (Corning Costar Corporation, Cambridge, SUA).	17 19
Un volum de 500 μl constând în 20 μl produs și 380 μl acetonitril 20% a fost separat prin HPLC (Jasco International CO. Ltd., Japonia) utilizând o coloană C18 Econosphere 5u (Alltech, SUA), o pompă PU-980 (Jasco, B&L systems, Boechout, Belgia), o unitate de gradient LG-980-02 (Jasco) și un detector MD 910 (Jasco).	21 23
Separarea s-a realizat prin utilizarea unui gradient linear, începând cu 20/80 apă + acid trifluoroacetic 0,05%/acetonitril + acid trifluoroacetic 0,05% (v/v) și terminând la 80/20 după 52 minute, la o rată de colectare de 1 ml/min. Cromatogramele au fost analizate la o lungime de undă între 195 nm și 420 nm.	25 27
Cromatogramele obținute au fost comparate cu cromatogramele antibioticelor cunoscute ca fiind produse de unele specii din genul <i>Bacillus</i> , iturin A ( $\geq 90\%$ HPLC, Sigma) și surfactin ( $\geq 98\%$ Sigma) care au fost dizolvate în metanol până la 500 mg/l în fiecare 20 μl injectați.	29 31
Toate fracțiunile cromatografice au fost colectate și analizate <i>in vitro</i> pentru activitate antifungică.	33
Extractul brut obținut dintr-un litru de mediu optimizat a fost de 600 mg/l (48 h creștere la 28°C).	35
Pe plăcile cromatografice în strat subțire, revelate în cloroform - metanol - apă (65:25:4 v/v/v) au putut fi vizualizate 9 spoturi în lumina UV la 254 nm, cu valoarea Rf: 0,15; 0,21; 0,24; 0,28; 0,32; 0,45; 0,54; 0,65; 0,71. Testul bioautografic cu <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> a evidențiat ca antagoniste 4 fracțiuni, care au avut Rf de 0,15; 0,21; 0,24; and 0,28.	37 39 41
Fracțiunile active de pe plăcile cromatografice au fost analizate prin HPLC.	
Analiza prin HPLC a evidențiat prezența a două grupuri de vârfuri, la momente de eluțiune comparabile cu cele ale lipopeptidelor standard care au fost utilizate, iturin între 20-30 minute și surfactin între 45-56 minute. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 1, care arată spectrul de detecție prin lichid-cromatografie de înaltă presiune al lipopeptidelor antibiotice din extractul metanolic al culturii de <i>B. subtilis</i> B49b.	43 45 47

# RO 125650 B1

1 În cadrul unui alt experiment a fost testată activitatea biosurfactantă a tulpinii *B.*  
2 *subtilis* B49b. Biosurfactanții produși de către *Bacillus subtilis* sunt cei printre cei mai  
3 cunoscuți pentru proprietățile antagoniste, dar aceștia joacă un rol important în mobilitatea  
4 bacteriilor. Activitatea biosurfactantă a tulpinii B49b a fost testată în supernatantul liber de  
5 celule bacteriene nediluat, diluat de 5x și de 10x. Pentru aceasta, tulpina a fost inoculată în  
6 10 ml mediu Luria Bertani (LB) și în mediul optimizat Jacques și incubate 18 ore la 150 rpm  
7 și 37°C. Supernatantul din cele două medii de creștere a fost colectat și s-au făcut diluții.  
8 Tensiunea superficială a fost măsurată cu un inel Du Nouy (K6 Kruss, GmbH, Hamburg,  
9 Germania) (Kuiper et al, 2004).

10 În ambele medii de creștere s-au înregistrat curbe similare ale tensiunii superficiale,  
11 dar în mediul optimizat tulpina a menținut o tensiune mai mare la diluții mai mari comparativ  
12 cu mediul LB; acest fapt demonstrează și pe această cale producerea mai mare de  
13 antibiotice de către tulpina B49b în mediul optimizat Jacques.

14 Tulpina B49b a fost caracterizată în ceea ce privește producerea unor compuși care  
15 pot contribui la activitatea de protecție biologică a acesteia. Chitinaza și proteaza au un rol  
16 în antagonism prin degradarea peretelui celulelor fungice, celuloza este importantă pentru  
17 colonizarea rădăcinilor plantelor, iar lactonaza acționează asupra fitopatogenilor gram-  
18 negativi care utilizează acil-homoserin-lactona (AHL) ca semnal implicat în sensibilitatea de  
19 grup (quorum sensing).

20 Testul pentru producerea de proteaze a fost efectuat pe mediul Bazai (BM; Meyer  
21 and Abdallah, 1978) agarizat completat cu lapte smântânit 5%. Tulpina B49b a fost inoculată  
22 prin înțeparea mediului, după care plăcile au fost incubate la 28°C. După 5 zile acestea au  
23 fost analizate pentru prezenta zonelor clare în jurul locului de inoculare, acestea indicând  
24 producerea de proteaze.

25 Activitatea celulazică a fost determinată prin descompunerea substratului carboxi-  
26 metil-celuloză. Tulpina B49b a fost însămânțată pe plăci cu mediu LB agarizat care în partea  
27 superioară s-au acoperit cu un strat de agar + 1% carboxi-metil-celuloză. După 5 zile de  
28 incubare la 28°C, plăcile au fost colorate pentru 30 minute cu 0,3% roșu de Congo. Ulterior  
29 acestea au fost clătite cu apă de robinet, iar colorantul a fost fixat prin incubare pentru 15 min  
30 cu 10% acid acetic. Prezența unei zone clare a indicat producerea de celuloze.

31 Producerea de chitinaze a fost analizată prin descompunerea substratului CM-chitin-  
32 RBV (Carboxi-metil-chitină cuplată cu Remazol Brilliant Violet, Loewe Biochemica GmbH,  
33 Germania). B49b a fost însămânțată pe plăci cu mediu BM agarizat, care în partea  
34 superioară s-au acoperit cu un strat de agar + 50% (v/v)

35 CM-Chitin-RBV ca sursă de carbon. După 5 zile acestea au fost analizate pentru pre-  
36 zența zonelor clare în jurul locului de inoculare, acestea indicând producerea de chitinaze.

37 Producerea de lactonază de către B49b a fost analizată prin inocularea a 2 ml de LB  
38 suplimentat cu 5 μM C6-hexanoil-homoserin-lactona (C6-HHL) și crescut peste noapte la  
39 28°C și agitare 150 rpm/min. A fost folosit un martor negativ reprezentat de un mediu  
40 neinoculat care a fost incubat în aceleași condiții pentru a verifica dacă se produce lactoliză.  
41 Plăci Petri cu mediul LB + 50 μg/ml Km au fost însămânțate cu tulpina biosenzor Cv026 de  
42 *Chromobacterium violaceum* (transformată să nu producă N-acil homoserin lactonă).  
43 Godeuri tăiate (5 mm ø) în mediul inoculat în plaja cu Cv06 au fost umplute cu 100 μl din  
44 cultura de B49b. Plăcile au fost incubate peste noapte la 28°C și analizate pentru  
45 prezența/absența halourilor violacee în jurul godeurilor inoculate cu bacteria. Absența culorii  
46 a indicat faptul că toată C6-HHL a fost degradată și deci producerea de lactonază.

47 Rezultatele au demonstrat că tulpina B49b produce protează și lactonază, dar nu  
48 produce chitinază sau celuloză.

# RO 125650 B1

În alte experimente s-a realizat testarea mobilității tulpinii B49b. Mobilitatea joacă un rol major în colonizarea rădăcinilor plantelor și este factorul direct implicat în mecanismul de combatere biologică prin competiție pentru nutrienți și spațiu. *Bacillus subtilis* B49b a fost testat pentru mobilitatea de migrare la suprafața agarului (swimming) și de agregare ca urmare a taxiei (swarming), împreună cu o tulpină martor cunoscută ca fiind nemobilă, *P. putida* PCL1760.

Testul a constatat în utilizarea unor culturi proaspete care au fost inoculate prin înțepare în centru plăcilor Petri cu mediu LB suplimentat cu agar în procent de 0,3% (pentru swimming) și 0,5% (pentru swarming).

Tulpina B49b a demonstrat că posedă ambele tipuri de mobilitate, acest rezultat confirmând și producerea de către această tulpină de protează și surfactin.

Prezența auxinei în supernatantul culturii tulpinii *B. subtilis* B49b a fost detectată printr-o metodă colorimetrică specifică pentru compușii indolici. Pe scurt, patru tulpini de *B. subtilis* au fost inoculate în mediul nutrient broth (NB: peptonă 5 g; extract drojdie 1,5 g, extract carne 1,5 g, NaCl 5 g) cu și fără triptofan (precursorul auxinei; 100 mg/ml) și incubate la 30°C și 150 rpm. După o zi, 4 și 8 zile de la incubare, 5 ml au fost centrifugați la 13.000 rpm timp de 10 min. 2 ml din supernatant au fost transferați într-un tub nou, în care s-au adăugat 100 ul 10 mM acid ortofosforic și 4 ml reactiv Salkowski (2% soluție FeCl<sub>3</sub> 0,5 M în 35% acid percloric). Absorbanța a fost citită la 530 nm, după menținerea tuburilor pentru 30 min, la temperatura camerei.

Atunci când compușii auxinici sunt produși în mediu adăugarea reactivului Salkowski determină virarea culorii către roz. Concentrația acidului indolil 3 acetic (IAA) în culturile studiate s-a determinat prin utilizarea unei curbe standard realizate cu concentrații diferite de auxină. Toate tulpinile analizate au atins faza staționară de creștere în 24 h, dar la acel moment nu s-a detectat auxina în mediile de cultură. După 8 zile de cultivare în mediul NB, cu și fără triptofan, toate tulpinile cercetate au produs auxina (tabelul 10).

Tabelul 10

Producerea de IAA (acid indolil 3 acetic) de către tulpinile testate\*

Mediu de cultură	Bsa12	<b>B49b</b>	Bc1c	B30
Nutrient broth (peptonă 5 g; extract drojdie 1,5 g, extract carne 1,5 g, NaCl 5 g) fără triptofan (100 μg/ml)	0,150 (6 μg/ml)	<b>0,166</b> <b>(6,64 μg/ml)</b>	0,156 (6,24 μg/ml)	0,156 (6,24 μg/ml)
Nutrient broth (peptonă 5 g; extract drojdie 1,5 g, extract carne 1,5 g, NaCl 5 g) suplimentat cu triptofan (100 μg/ml)	0,208 (8,32 μg/ml)	<b>0,210</b> <b>(8,4 μg/ml)</b>	0,197 (7,88 μg/ml)	0,191 (7,64 μg/ml)

\*Valorile reprezintă absorbanța, respectiv, cantitatea de IAA în μg/ml în supernatantul culturii, după 8 zile de creștere a bacteriilor în mediul nutrient broth (peptonă 5 g; extract drojdie 1,5 g, extract carne 1,5 g, NaCl 5 g), suplimentat sau nu, cu triptofan (100 μg/ml).

# RO 125650 B1

1 Toate tulpinile de *Bacillus subtilis* testate au răspuns pozitiv la prezența triptofanului  
în mediu, iar cea mai mare cantitate de auxină a fost produsă de tulpina B49b (6,64 µg/ml  
3 și 8,4 µg/ml fără și, respectiv, cu triptofan). Cantitatea de auxină produsă de către toate  
izolatele testate a variat între 6 și 6,64 µg/ml (NB fără triptofan) și 7,64...8,4 µg/ml cu triptofan  
5 (NB suplimentat cu triptofan, 100 µg/ml mediu).

În concluzie, tulpina B49b a demonstrat că are calități de agent de combatere  
7 biologică față de un număr mare de ciuperci fitopatogene de sol, având și o activitate de  
stimulare a creșterii plantelor și de favorizare a nodulării rădăcinilor de leguminoase, datorită  
9 producerii de auxine.

Tulpina B49b produce iturin și surfactin, antibiotice lipopolipeptidice, sintetizate  
11 nonribozomal, cu acțiuni de inhibare a dezvoltării ciupercilor fitopatogene. De asemenea  
tulpina B49b produce protează și lactonază, enzime care joacă un rol important  
13 stoparea/inhibarea unor mecanisme care stau la baza fitopatogenității unor microorganisme.

*B. subtilis* B49b a dovedit că este mobil pe medii (semi)agarizate, proprietate care  
15 poate fi corelată cu producerea de surfactin și protează.

Tulpina B49b are capacitatea de a transforma precursorii aminoacizi (triptofan) în  
17 fitohormoni auxinici. Acest fapt, asociat capacității de dezvoltare endofită, sugerează  
capacitatea de producere de fitohormoni *in situ* (endofită) și deci și o activitate de stimulare  
19 a creșterii plantelor și de favorizare a nodulării rădăcinilor de leguminoase.

Utilizarea tulpinii *B. subtilis* B49b (număr de depozit NCAIM (P) B001360) ca  
21 bioinoculant reprezintă o soluție alternativă la utilizarea pesticidelor în combaterea ciupercilor  
fitopatogene de sol.

# RO 125650 B1

## Revendicare

1

Tulpină de *Bacillus subtilis* B49b, cu numărul de depozit NCAIM (P) B001360, antagonistă față de ciuperci fitopatogene de sol care produc ofilirea și căderea răsadurilor: *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum f. sp. radicis-lycopersici* *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*, datorită producerii de antibiotice polipetidice, iturin și surfactin, și de enzime hidrolitice, protează și lactonază, și care are și o activitate de favorizare a nodulării rădăcinilor de leguminoase, datorită producerii endofite de auxine.

3

5

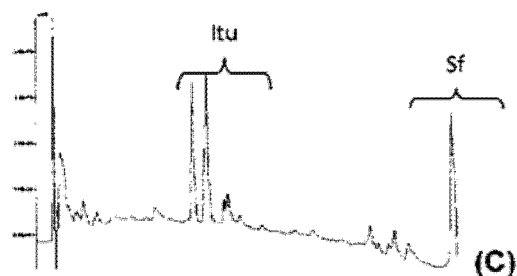
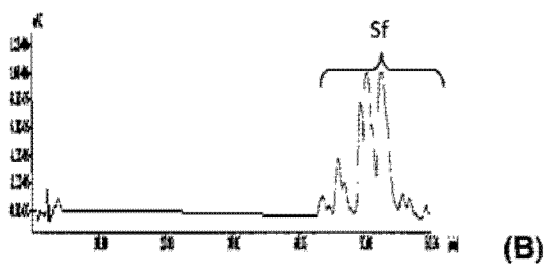
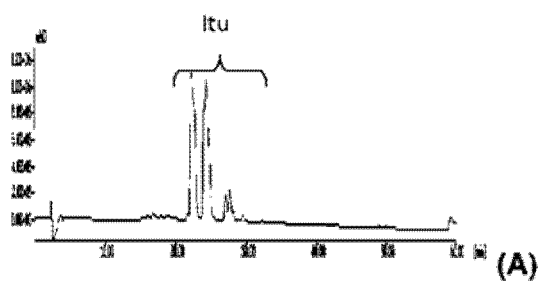
7

9

(51) Int.Cl.

C12N 1/20<sup>(2006.01)</sup>;

A01N 63/02<sup>(2006.01)</sup>



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 326/2013