



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00144**

(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:
• **OANCEA FLORIN,** *STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **SICUIA OANA,** *STR.VICINA NR.3, BL.33,
SC.3, AP.154, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;*

• **DINU SORINA,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **ZAMFIROPOL ROXANA,** *STR.NADEȘ
NR.42 A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **GYORGY EVA,** *STR.TOPLIȚA NR.50,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;*
• **BEATA ABRAHAM,** *STR.CULMEI NR.11,
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;*
• **LANYI SZABOLCS,** *STR.MIKO NR.21,
MIERCUREA CIUC, HR, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
T. J. BEVERIDGE ET AL.,
**"METHODS FOR GENERAL AND
MOLECULAR MICROBIOLOGY", P. 237,**
EDITOR-ȘEF C.A. REDDY, ASM PRESS,
WASHINGTON D.C., 2007; US 4366245

(54) **PROCEDEU DE IZOLARE A BACTERIILOR FIXATOARE DE
AZOT ÎN SIMBIOZĂ DIN NODOZITĂȚILE PLANTELOR
LEGUMINOASE**



RO 125669 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de izolare, din nodozitățile plantelor leguminoase,
a alfa-proteobacteriilor (denumite generic rizobii), care fixează azotul în simbioză și sunt
3 utilizate, ca tratament, pentru (bio/agro)inocularea seminței leguminoaselor cultivate.

5 Sunt cunoscute mai multe procedee de izolare din nodozitățile leguminoaselor a
bacteriilor fixatoare de azot în simbioză. Procedeu cel mai des utilizat (descriș recent în
7 secțiunea 11.3.2. a celei de a treia ediții a manualului T. J. Beveridge et al., *Methods for
general and molecular microbiology*, p. 237, editor-șef CA. Reddy, ASM Press, Washington
9 DC, 2007) implică recoltarea nodulilor, sterilizarea chimică a acestora (prin imersare timp de
11 3...6 min, în soluție de HgCl₂ 0,1%, urmată de trecerea în etanol 75%, pentru alte câteva
13 minute și spălarea cu apă distilată sterilă), sfărâmarea nodulilor cu un forceps steril,
suspendarea acestora în apă sterilă, diluarea aseptică a suspensiei, urmată de inocularea
suspensiei diluate (de obicei, prin epuizarea ansei sau distribuirea uniformă cu spatulă
Drigalski) pe medii specifice agarizate - cum este mediul YEMA (extract de drojdie - manitol
-agar) cu roșu de Congo.

15 Procedeu descriș mai sus prezintă dezavantajul de a nu realiza o sterilizare semnifi-
cativă a nodulilor.

17 **US 4366245** descrie un procedeu de izolare a bacteriilor simbiotice, cu o etapă
îmbunătățită de sterilizare chimică, în care se folosește o soluție de 3% tetraoxid de osmiu,
19 în tampon fosfat salin (pH 7,2), cu 0,6 clorură de calciu. Acest procedeu înlătură dezavantajul
sterilizării incomplete a materialului vegetal și oferă posibilitatea vizualizării zonei sterilizate
21 (datorită fixării și înnegririi acesteia). Pe lângă faptul că utilizează un produs extrem de toxic
(tetraoxidul de osmiu), procedeu descriș mai sus are și dezavantajul de a nu elimina
23 contaminanții biologici existenți în interiorul nodulilor, respectiv, a endofiților oportuniști care
co-colonizează nodulii legumelor și au o capacitate de creștere mai ridicată pe mediile
25 uzuale, comparativ cu rizobii, care au creștere lentă și trebuie să se rediferențieze din
bacteroizii formați în noduli.

27 Principala problemă tehnică, pe care o rezolvă invenția, este de a realiza un
procedeu prin care să se favorizeze dezvoltarea preponderentă a alfa-proteobacteriilor
29 (denumite generic rizobii și incluse în prezent în genurile *Allorhizobium*, *Azorhizobium*,
Bradyrhizobium, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* și *Sinorhizobium*) din noduli de pe rădăcinile
31 plantelor leguminoase și să fie inhibată dezvoltarea endofiților oportuniști care co-
colonizează nodulii.

33 Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape: recoltarea nodulilor;
dezinfecția superficială a acestora prin imersare repetată, de trei ori, câte 5 min, în soluție
35 0,01% de clorură de alchil-dimetil-benzil amoniu; spălarea cu apă distilată sterilă; sfărâmarea
aseptică a nodulilor într-o soluție de tampon fosfat salin steril, pH 7,2, care conține 5 mg/l
37 Na₂SeO₃·5H₂O, urmată de omogenizarea prin agitare la vortex, timp de 2...3 min; diluarea
de 10³...10⁵ ori a omogenatului de noduli, urmată de inocularea omogenatului diluat pe un
39 mediu cu formula: ribitol - 10 g/l, extract de drojdie - 1 g/l, K₂HPO₄ - 0,5 g/l, MgSO₄·7H₂O -
0,2 g/l, NaCl - 0,2 g/l, CaSO₄ - 0,2 g/l, albastru de bromtimol - 0,02 g/l, FeSO₄·7H₂O - 0,01 g/l,
41 edetat disodic - 0,01 g, Na₂SeO₃·5H₂O - 0,006 g/l, MnSO₄ - 0,005 g/l, (NH₄)₂MoO₄·2H₂O -
0,002 g/l, agar 20 g/l; incubarea timp de 4...7 zile, la temperatura de 28°C, urmată de
43 selectarea și purificarea ulterioară, pe mediu cu aceeași formulă de mai sus, a coloniilor care
prezintă un aspect bombat și modifică culoarea indicatorului albastru de bromtimol.

45 Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje:

47 - permite o dezinfecție superioară a suprafeței nodulilor, prin folosirea unui
dezinfecțant uzual, clorură de alchil-dimetil-benzil amoniu/clorură de benzalkolium, care are
o putere semnificativă de pătrundere și un spectru larg de acțiune;

RO 125669 B1

- asigură o selectivitate ridicată pentru alfa-proteobacterii și, în special, pentru rizobii, datorită prezenței selenitului în concentrație relativ ridicată în mediul de dispersie-omogenizare a nodulilor; 1
 - stimulează rediferențierea bacteriozilor din noduli, datorită ribitolului, ca singură sursă carbon din mediul de cultivare a izolatelor; 3
 - inhibă creșterea endofiților contaminanți din noduli, datorită formulei specifice a mediului de izolare, cu sursă de carbon specifică (ribitol) și factori de selectivitate (selenit de sodiu); 5
 - favorizează diferențierea coloniilor de rizobii, datorită stimulării producerii de exopolizaharide, ca urmare a compoziției specifice a mediului de izolare și a prezenței bromtimolului ca indicator de pH. 7
- Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu. 9
- Exemplu.** Se recoltează rădăcini de mazărice păroasă, *Vicia vilosa*, care se spală de sol deasupra unei site cu ochiuri de minimum 0,2 mm. Se separă, de rădăcini, nodulii de culoare roz. Un număr de 20...25 noduli se trec pentru dezinfecție superficială, într-un Erlenmeyer de 100 ml, care conține 25 ml soluție 0,01% de clorură de alchil-dimetil-benzil amoniu (obținută prin diluarea de 1000 ori a unei soluții concentrate de dezinfectant tehnic 10%). Se menține timp de 5 min și apoi se scurge soluția dezinfectantă. Se repetă operațiile de mai sus, de scurgere a soluției dezinfectante și de înlocuire cu o soluție dezinfectantă proaspătă. Se spală nodulii cu apă distilată sterilă și apoi se trec, fiecare, într-o eprubetă sterilă de 10 ml, prevăzută cu dop de vată. Se aduc aseptice 10 ml dintr-o soluție de tampon fosfat salin, pH 7,2, care conține 5 mg/l $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, peste fiecare nodul. Se sfărâmă aseptice nodulii cu ajutorul unui forceps steril. Se omogenizează nodulii sfărâmați și apoi se omogenizează prin agitare la vortex, timp de 2...3 min. Se diluează de $10^3 \dots 10^5$ ori omogenatul de noduli. Suspensia astfel diluată se inoculează, prin epuizarea ansei, pe un mediu agarizat, cu următoarea formulă: ribitol - 10 g/l, extract de drojdii - 1 g/l, K_2HPO_4 - 0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g/l, NaCl - 0,2 g/l, CaSO_4 - 0,2 g/l, albastru de bromtimol - 0,02 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 g/l, edetat disodic - 0,01 g, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,006 g/l, MnSO_4 - 0,005 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 g/l, agar 20 g/l. Se incubă timp de 4 zile la temperatura de 28°C. Se selectează coloniile care prezintă un aspect bombat și modifică culoarea albastrului de bromtimol și se purifică prin pasaje pe mediu agarizat, cu aceeași formulă de mai sus, repartizat ca mediu înclinat, în eprubete de 10 ml. 11
- Eficacitatea unor tulpini de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, izolate prin aplicarea procedurii de mai sus, a fost testată comparativ față de o tulpină etalon de *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2335/ATCC 10314. 13
- Tulpinile testate (ATCC10314 și un izolat propriu obținut conform procedurii descris mai sus și denumit Mz. 269) au fost cultivate timp de 3 zile, la temperatura de 28°C, pe eprubete cu mediu agarizat înclinat (mediu agarizat cu compoziția conformă celei descrise mai sus). În eprubetele pe care au crescut tulpinile de testat, s-au adăugat câte 5 ml de tampon fosfat salin steril. S-a omogenizat, iar din omogenizat s-au prelevat 0,1 ml, care au fost diluați aseptice, până la o densitate optică de 0,5 la 660 nm. Din diluția normalizată la DO_{660} , s-au prelevat 0,1 ml, care au fost depuși pe rădăcinile unor plante de 5...6 mm, rezultate din semințe de *Vicia villosa*, sterilizate la suprafață prin spălări succesive cu hipoclorit 2%, alcool etilic 30% și apă distilată sterilă. Semințele sterilizate au fost germinate în prealabil timp de 2 zile pe apă agarizată, în condiții aseptice. Plantulele inoculate au fost cultivate apoi în punji de creștere sterile (furnizate de Mega International), care conțineau mediu semiagarizat, lipsit de azot. 15
- 17
- 19
- 21
- 23
- 25
- 27
- 29
- 31
- 33
- 35
- 37
- 39
- 41
- 43
- 45
- 47

RO 125669 B1

1 Mediul semiagarizat fără azot, pe care au fost cultivate plantulele de mazărice
2 păroasă, a fost mediul nutritiv Crone modificat de Bryan (Hewit, 1965), a cărui formulă este
3 prezentat în tabelul 1 (macroelemente nutritive), la care se adaugă 5 ml/l din soluția de (oligo
și microelemente nutritive) prezentată în tabelul 2 și se agarizează cu 10 g/l.

Tabelul 1

7 *Soluția nutritivă Crone modificată de Bryan (soluție nutritivă fără azot), utilizată pentru
cultivarea plantelor inoculate cu rizobii*

Sare minerală	Formula	grame/l	mg/l - ppm (soluția finală)
Clorură de potasiu	KCl	10,0 g	393,3 ppm, K
Sulfat de calciu	CaSO ₄ ·2(H ₂ O)	2,5 g	116,3 ppm, Ca
Sulfat de magneziu	MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	2,5 g	18,5 ppm, Mg
Fosfat tricalcic	Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,5 g	80,2 ppm, P
Fosfat feric cu citrat de fer		2,5 g	26,2 ppm, Fe

Tabelul 2

17 *Soluția de oligo și microelemente care se adaugă la soluția Crone*

Sare minerală	Formula	grame/l	mg/l - ppm (soluția finală)
Acid boric	H ₃ BO ₃	0,57	0,50 ppm B
Sulfat de mangan	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,31	0,50 Mn
Sulfat de zinc	ZnSO ₄ ·7(H ₂ O)	0,09	0,10 Zn
Sulfat de cupru	CuSO ₄ ·5(H ₂ O)	0,08	0,08 Cu
Molibdat de sodiu	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,098	0,04 Mo
Clorură de cobalt	CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,0008	0,001 Co

25 Pungile de creștere cu mediu de cultură fără azot semiagarizat și plantulele inoculate
27 au fost depuse pe standurile lor de creștere, învelite în folie de staniol și trecute într-o
cameră de creștere. Plantele au fost crescute în condiții controlate (temperatură de
29 22°C±0,2°C, iluminare 12 h pe zi cu 250 umol fotoni m⁻²s⁻¹). După 20 de zile de cultivare, s-au
recoltat nodulii plantelor de mazărice păroasă. Spălarea rădăcinilor s-a efectuat deasupra
31 unei site cu ochiuri mai mici de 0,25 mm, pentru a se recupera eventualele nodozități
desprinse prin spălare. Nodozitățile radiculare, proaspăt recoltate de pe fiecare plantă, au
33 fost cântărite cu precizie (±1 mg) și s-au repartizat în două părți egale.

35 O primă parte s-a introdus imediat într-un flacon de sticlă brun de 1000 ml, prevăzut
cu dop din cauciuc, fixat cu dop metalic înșurubat (flacon vaccin), care conține 25 ml soluție
glucoză 1% în tampon TRIS-HCl pH=7,4 și acetilenă la o presiune parțială (p_{acetilena}) de
37 0,1 atm.

39 Presiunea parțială de acetilenă s-a realizat prin injectarea a 100 ml acetilenă într-un
flacon de 1000 ml, cu ajutorul unei seringi de 10 ml, prin dopul din cauciuc al flaconului. S-a
incubat 4...8 h, la temperatura de 20°C. La terminarea perioadei de incubare, din flacoane
41 s-au prelevat volume bine determinate de gaz, cu ajutorul unor (micro)seringi, prin dopul din
cauciuc al flaconului. Probele de gaz s-au injectat în injectorul unui gaz-cromatograf, în capul

RO 125669 B1

unei coloane cromatografice de 1,5...2 x 2...2,5 m, umplută cu Porapak N și menținută la 50°C. S-a utilizat azotul ca gaz purtător, iar detectarea etenei și a acetilenei s-a realizat cu un detector de ionizare în flacără.

S-a lucrat cu debite de eluție cuprinse între 20 și 25 ml/s azot, iar debitele de operare ale detectorului de ionizare în flacără au fost de 10...15 ml H₂ și 5...10 ml aer. În prealabil, s-a efectuat determinarea timpilor de retenție pentru etenă și acetilenă și a înălțimii picurilor cromatografice la concentrație etalon de etenă.

Calculul rezultatelor se realizează după următoarea formulă:

$$\text{Conc. C}_2\text{H}_2 \text{ în probă} = C_e \times H_p/H_e$$

unde:

- C_e - concentrație etalon,
- H_p - înălțime pic probă,
- H_e - înălțime pic etalon.

$$\text{Activitate acetilenreductazică} = C_p C_2H_2 \times V_p/M_n \times h$$

unde:

- C_pC₂H₂ - concentrația de acetilenă în probă (micromol),
- V_p - volumul de probă,
- M_n - masa nodozităților,
- h - numărul de ore de incubare.

În cea de-a doua parte a nodozităților, s-a determinat leghemoglobina, cu ajutorul metodei piridină - hemocrom, descrisă de Appleby și Bergersen (1980), și proteina totală cu reactiv Bradford (1976), după extragerea proteinelor totale în tampon fosfat salin.

Tabelul 3

Eficiența fixării azotului în nodozitățile formate de plantele de Vicia villosa, cu o tulpină izolată conform procedurii comparativ cu o tulpină tip

Nodozități	Leghemoglobina ¹	Activitate acetilenreductazică ²	Proteină totală noduli ³
<i>Vicia villosa</i> (măzărice de toamnă) - Ribv ATCC 10314	84,5b	87,8b	12,8a
<i>Vicia villosa</i> (măzărice de toamnă) - Ribv Mz269	108,5a	105,3a	11,5a

1 - nmol hem/g nod sp; 2 - μM etenă/g nod su oră; 3 - mg prot/g nod su. Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P<0,05. Valori medii rotunjite la o zecimală, obținute din cel puțin patru repetiții.

Datele din tabelul 3 demonstrează faptul că tulpina de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae Mz269, izolată conform procedurii descris prin prezenta invenție, este o tulpină cu înaltă activitate biologică, care prezintă o activitate biologică la nivelul tulpinii tip, utilizată în acest studiu. Tulpina a fost depusă la NCAIM Budapesta (număr de depozit NCAIM B001351).

Rezultatele prezentate susțin eficiența procedurii descris în prezenta invenție, pentru izolarea, din nodozitățile plantelor leguminoase, a alfa-proteobacteriilor (denumite generic rizobii), care fixează azotul în simbioză și sunt utilizate ca tratament pentru (bio/agro)inocularea seminței leguminoaselor cultivate.

RO 125669 B1

Revendicare

1

3

5

7

9

11

13

15

Procedeu de izolare a bacteriilor fixatoare de azot în simbioză, din nodozitățile plantelor leguminoase, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: recoltarea nodulilor; dezinfectia superficială a acestora prin imersare repetată de trei ori, câte 5 min, în soluție 0,01% de clorură de alchil-dimetil-benzil amoniu; spălarea cu apă distilată sterilă; sfărâmarea aseptică a nodulilor într-o soluție de tampon fosfat salin steril, pH 7,2, care conține 5 mg/l $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, urmată de omogenizarea prin agitare la vortex, timp de 2...3 min; diluarea de $10^3 \dots 10^5$ ori a omogenatului de noduli, urmată de inocularea omogenatului diluat pe un mediu cu formula: ribitol - 10 g/l, extract de drojdii - 1 g/l, K_2HPO_4 - 0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g/l, NaCl - 0,2 g/l, CaSO_4 - 0,2 g/l, albastru de bromtimol - 0,02 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 g/l, edetat disodic - 0,01 g, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,006 g/l, MnSO_4 - 0,005 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,002 g/l, agar 20 g/l; incubarea timp de 4...7 zile, la temperatura de 28°C, urmată de selectarea și purificarea ulterioară, pe mediul cu aceeași formulă de mai sus, a coloniilor care prezintă un aspect bombat și modifică culoarea indicatorului albastru de bromtimol.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 328/2013