



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 01073**

(22) Data de depozit: **22.12.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.08.2013** BOPI nr. **8/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.06.2011 BOPI nr. **6/2011**

(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.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **OANA SICUIA, STR.VICINA NR.3, BL.33,**
*SC.3, AP.153, 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;

• **CONSTANTINESCU FLORICA,**
*STR.EMANOIL PORUMBARU NR.67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 6960342 B2; US 7615366 B2

(54) **TULPINĂ DE BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS
ANTAGONISTĂ FAȚĂ DE CIUPERCI FITOPATOGENE DIN
RESTURI VEGETALE**



RO 126362 B1

1 Invenția se referă la o nouă tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens*, antagonistă față
de ciuperci fitopatogene din resturi vegetale, destinată utilizării ca bioinoculant, care a fost
3 obținută prin selecție în trepte a unor izolate naturale din rizosfera detrandafir, și care prezintă
concomitent antagonism pentru fitopatogeni, capacitate de stimulare a creșterii
5 plantelor de cultură și activitate de mineralizare a materiei organice.

7 Sunt cunoscute mai multe tulpini de *Bacillus amyloliquefaciens*, destinate utilizării ca
bioinoculant agricol.

9 Brevetul **US 6960342 B2** descrie tulpina B190 (depozitată sub numărul CCRC
910182 la FIRDI, Hsin-Ciu, Taiwan), utilizată pentru protecția crinului taiwanez (*Tricyrtis
formosana*) împotriva putregaiului cenușiu (*Botrytis elliptica*).

11 Brevetul **US 7615366 B2** prezintă tulpina KTGB0202 de *B. amyloliquefaciens* (număr
de depozit KCTC 10564BP, KCTC, Taejon, Republica Coreea) care este activă față de o
13 gamă largă de fitopatogeni.

15 Cererea de brevet **KR 20060021162** protejează tulpina MJ-3 de *B. amyloliquefaciens*,
care este concomitent antagonistă pentru fitopatogeni și cu o activitate de favorizare a
creșterii vegetale.

17 Brevetul **US 7452445 B2** se referă la utilizarea tulpinii PMBP-m7 de *B.
amyloliquefaciens* (depozitată cu numărul PTA-5819 la ATCC, Manassas, SUA), împreună
19 cu alte tulpini de *Bacillus*, pentru descompunerea materialului vegetal și formarea unei
material celulozic fibrilar. Deși materialul rezultat este apoi utilizat în agricultură (prin formare
de mulci organic), brevetul **US 7452445 B2** nu descrie caracteristici de antagonism pentru
21 fitopatogeni și/sau de stimulare a creșterii plantelor pentru tulpina PMBP-m7.

23 Până în prezent, nu au fost descrise tulpini de *B. amyloliquefaciens* care să prezinte
concomitent antagonism pentru fitopatogeni, capacitate de stimulare a creșterii plantelor și
25 activitate de mineralizare a materiei organice (și, în special, a resturilor vegetale), deși aceste
bacterii sunt cunoscute pentru capacitatea lor ridicată de a produce exoenzime, inclusiv,
27 exohidrolaze active în degradarea materialului lignocelulozic.

29 Problema tehnică, pe care urmărește să o rezolve invenția, constă în combaterea
agenților fitopatogeni, concomitent cu stimularea creșterii plantelor și mineralizarea materiei
organice (și, în special, a resturilor vegetale).

31 Tulpina *Bacillus amyloliquefaciens*, codificată B165 (număr de depozit NCAIM
B001363, Budapesta, Ungaria), conform invenției, prezintă un spectru larg de acțiune
33 antifungică față de ciuperci fitopatogene din resturi vegetale *Rhizoctonia solani*, *Pythium
ultimum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum f. sp.
radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*, datorită producerii de
35 antibiotice lipopeptidice și policetidice, și de enzime hidrolitice, protează și lactonază, o
capacitate semnificativă de stimulare a creșterii plantelor, datorită producerii endofite de
37 auxine și capacitate de mineralizare a materialului vegetal, datorită producerii de amilază,
fitază și celulază.

39 Tulpina *B. amyloliquefaciens* B165 prezintă următoarele avantaje:

- 41 - creștere bogată pe mediile uzuale utilizate pentru creșterea bacililor gram pozitivi
sporulați;
- 43 - stimularea creșterii plantelor, datorită producerii *in situ* de fitohormoni;
- capacitate de a intensifica mineralizarea materialului vegetal;
- 45 - complementaritate cu tehnologiile agricole conservative, în care, datorită faptului
că sunt reduse lucrările solului și se menține peste 30% din teren acoperit cu resturi
47 vegetale, semințele plantelor de cultură germinează mai greu și este creat un cadru favorabil
atacului agenților fitopatogeni;
- 49 - managementul inoculului de ciuperci fitopatogene din resturile vegetale.

RO 126362 B1

Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos.

Exemplu. Tulpina B165 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, din rizosfera unor plante de trandafir (*Rosa thea hybrida* cv. Carina). Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 150 izolate de bacili sporulanți gram-pozitivi, pe baza acțiunii de protecție a diferitelor plante de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola*); producerii *in situ* de fitohormoni și acțiunii de mineralizare a materialului vegetal.

În vederea încadrării taxonomice, tulpina B165 a fost caracterizată din punct de vedere morfologic (tabelul 1), biochimic - fiziologic (tabelul 2) și pe baza secvenței 16S rADN (tabelul 3).

Tabelul 1

Morfologia coloniilor de *Bacillus amyloliquefaciens* B165 pe diferite medii după cultivare timp de 24 h

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii B165		
		culoare	aspect exterior	dimensiuni (24 h)
Medii gelificate semi-sintetice	mediul cu decoct de cartof-glucoză-agar (CGA)	brun	ruogoase, margini neregulate sub formă de filamente	colonii mari
	mediu cu extract de carne (beef extract)	crem	ruogoase, centrul proeminent, încrețit, margini neregulate	colonii mari
	mediul cu decoct de fasole	crem-brun	ruogoase, margini neregulate	colonii medii
	mediul cu extract de sol	crem-brun	ruogoase, margini neregulate	colonii medii
Medii solide naturale	felii de cartof sterile	brun	ruogoase, margini neregulate, centru cu rugozități fine	colonii mari
Medii lichide	mediul 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 B165

Testul biochimic	B165
Reacția Gram	165
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+

RO 126362 B1

Tabelul 2 (continuare)

1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35

Testul biochimic	B165
Reducerea NO ₃ →NO ₂	+
Creștere anaerobă	-
Urează	-
Oxidază	+
Catalază	+
Sursa de carbon:	
malonat	+
citrat	+
propionat	-
tartrat	+
trehaloză	+
zaharoză	+
maltoză	+
glucoză	+
xiloză	+
manoză	+
fructoză	+
sorbitol	+
manitol	+
inozitol	+
glicerol	+
amidon	+
Acidifică:	
xiloza	+
glucoza	+
zaharoza	+
maltoza	+
fructoza	+
arabinoza	±
manitol	+
rafinoza	+
celobioza	+
Toleranța la NaCl 7%	+
Toleranța la NaCl 5%	+

RO 126362 B1

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin aplicarea unui protocol de lucru, caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure - colonii izolate, tehnica însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului bacterian; electroforeză în gel pentru detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 16S rADN prin tehnica PCR și electroforeză în gel; purificarea ADN-ului ribozomal; sequencing Reaction - PCR înainte de secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-ului ribozomal. Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele au fost analizate folosind programul CHROMAS 2.33 (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene NCBI (National Center for Biotechnology Information), s-a realizat cu ajutorul programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3, acestea dovedind o similaritate de 99,4% cu alte tulpini de *B. amyloliquefaciens*.

Tabelul 3

Identificarea tulpinii pe baza similarității secvenței 16 S rADN cu tulpinile din GenBank

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN (perechi de baze - pb)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinii pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank (nr. de referință); - procentul de similaritate
B165	510	TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAG ATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT AACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTT TGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGC TACCACTTACAGATGGACCCNCNCGCATTAGCTAGTT GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAG CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC GCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCT CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGG CGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> străin GZUB22 (FJ457115.1) - similaritate: 99,4%

Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii B165 a fost efectuată pe mediul cu cartof dextroză agar (CGA). Tulpina B165 (dintr-o cultură de 24 h) a fost însămânțată pe mediu prin strierea cu ansă 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 însămânțate 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. Rezultatele (tabelul 4) au demonstrat ca tulpina B165 produce metabolini antifungici, care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciupercile toxigene *Aspergillus flavus* (9 mm) și *Fusarium graminearum* (9 mm). Acțiunea biologică este semnificativă și față de *R. solani* și *F. oxisporum* f. sp. *radicis lycopersici* (8 mm), *S. sclerotiorum* (7 mm), *P. ultimum* (6 mm), *S. bataticola* (5 mm).

Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Bacillus subtilis* B165 asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm)

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina B165
<i>Rhizoctonia solani</i>	8
<i>Pythium ultimum</i>	6
<i>Fusarium graminearum</i>	9
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	8
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	7
<i>Sclerotium bataticola</i>	5
<i>Aspergillus flavus</i>	9

Tulpina B165 a fost testată în condiții de seră în ceea ce privește eficacitatea în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*), care atacă frecvent în stadiul de plantulă și produc pagube.

Operațiunile implicate au constat în pregătirea inoculului bacterian prin înprospătarea 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 10⁸ 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 mranită + 1/4 nisip. Acesta a fost amestecat uniform cu inoculul fungic (~ 2 x 10⁶ spori/ kg sol) și apoi distribuit în tăvi din plastic (32/24 cm), cu 48 h înainte de semănat.

Materialul vegetal (semințe de floarea soarelui cv. Festiv) a fost tratat înainte de semănat prin imersie, timp de 20 min, în suspensiile bacteriene al căror titru a fost stabilit la 10⁸ ufc/ml.

În primul experiment, au fost testate împreună cu B165 alte 6 tulpini de *B. subtilis*, și anume: Bs 23, Bs 27, Bs 30, Bs 36, Bs 45, Bs 48. Inoculul 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 (cv. Festiv).

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.

Calculul analizei variantei s-a efectuat cu programul ANOVA.

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:

La cultura de floarea-soarelui, lungimea rădăcinii a fost influențată de factorul A (inoculul fungic) independent de factorul B - inoculul bacterian (tabelul 5). Complexul fungic 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.

Tabelul 5

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

Factor A (inocul fungic)	Tiradin 70 PU (4 g/kg)	Martor nebact, inoculat	Bs23	Bs27	Bs30	Bs36	Bs5	Bs48	B165	Medii factor A
R-F-P	59,05bcd	27,77i	68,68b	59,57bcd	94,82a	65,27bc	39,40ghi	55,87b-f	96,75a	63,02a
Ss	49,03c-g	27,85i	40,31f-i	37,61ghi	60,83bc	30,96hi	59,76bcd	36,67ghi	67,82b	45,65b
Sb	51,02c-g	27,33i	40,35f-i	32,44hi	41,79e-i	26,51i	56,78b-e	44,6d-h	49c-g	41,02b
Medii factor B	53,04b	27,65e	49,781bc	43,208bc	65,817a	40,917cd	52,01b	45,70bc	71,19a	

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

Studiul interacțiunii tratamentelor biologice asupra rădăcinilor plantelor de floarea-soarelui a relevat următoarele: (i) în cazul utilizării complexului R.F.P. ca inocul de patogeni la sol, tulpinile B165 și Bs30 au determinat cele mai mari creșteri ale rădăcinilor plantelor (asigurate statistic față de martorul netratat), urmate de izolatele de *Bacillus* Bs23, Bs36, 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 bacterizate cu tulpinile de *B. amyloliquefaciens* B165 și *Bacillus subtilis* Bs30.

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*.

Izolatele de *Bacillus* antagoniste, independent de ciupercile de sol experimentate, au determinat cele mai mari creșteri ale lungimii totale a plantelor, asigurate statistic față de martorul netratat, în variantele bacterizate cu izolatele *S. amiloliquefaciens* B165 și *Bacillus subtilis* Bs30, acestea având valori distinct semnificative față de tulpinile Bs23, Bs27, Bs45, Bs48 și Bs36.

Tabelul 6

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

Factor A (inocul fungic)	Tiradin 70 PU (4 g/kg)	Martor nebact. Inoculat	Bs23	Bs27	Bs30	Bs36	Bs45	Bs48	B165	Medii factor A
R-F-P	136,11d-f	73,11m	150,39cd	134,68dei	186,53a	129,35efg	104,15ij	117,23g-j	172,51ab	133,78a
Ss	115,66g-j	65,23m	124,66fgh	123,36fgh	127,74efg	113,71 gi	133,86der	128,29efg	145,77cde	119,81b
Sb	127,23e-h	78,22lm	118,80f-j	100,24jk	144,51cde	105,88ij	121,38f-i	113,83g-j	153,88bc	118,21b
Medii factor B	126,34bc	72,19d	131,28b	119,42bc	152,92a	116,32c	119,80bc	119,78bc	153,38a	

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P < 0,05$ (DS A5%= 6,263 DS B5%= 12,041 DSAB5%= 18,789)

Interacțiunea celor două tipuri de inocul biologic a demonstrat faptul că tulpinile B165 și Bs30 au favorizat distinct semnificativ și creșterea totală a plantelor de floarea-soarelui comparativ cu martorul netratat și cu varianta tratată chimic, pentru toate tipurile de inocul fungic (tabelul 6).

RO 126362 B1

1 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
3 (tabelul 7).

5 *Tabelul 7*
7 *Eficacitatea diferitelor tulpini de B. amyloliquefaciens în prevenirea atacului unor ciuperci*
telurice la cultura florii soarelui (cv. Festiv), în condiții de seră

Inocul fungic*	R.F.P.*		S. s.		S.b.	
	Varianta tratament	% plante sănătoase răsărite	Eficacitate a (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitate a (%)	% plante sănătoase răsărite
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
B 165	96	89	100	100	100	100
Tiradin 70 PU (4 g/kg)	83	64	100	100	100	100
Mt. Netratat	53	-	55	-	50	-

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

În variantele infectate cu complexul R.F.P., cea mai mare eficacitate (> 50%) s-a obținut în cazul bacterizării semințelor cu tulpinile B165, Bs30, Bs23 și Bs27.

În variantele infectate cu *S. sclerotiorum* și *S. bataticola*, eficacitatea maximă s-a obținut în varianta tratată cu tulpina B165 (100%).

Tratamentele chimice cu Tiradin 70 PU (4 g/kg semințe) au avut valori ale eficacității situate între 64 și 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*.

Tulpina B165 a avut o eficacitate de combatere a atacului ciupercilor fitopatogene de sol superioară matorului etalon chimic.

Pentru analiza produșilor secundari de metabolism din categoria policetidelor și a lipopeptidelor, s-au extras probe din supernatantul culturilor de B165 pe mediu Landy (Glucoză 20 g; MgSO₄·7H₂O 0,5 g; KCl 0,5 g; acid glutamic 5 g; MnSO₄·H₂O 5 mg; Fe(SO₄) soluție 1% 0,1 ml; CuSO₄·5H₂O soluție 1% 0,02 ml, apă până la 1000 ml). Bacteriile au fost crescute 12 și 72 h, la 37°C. Probele au fost extrase pe un cartuș de Chromafix C18ec (Machery-Nagel, Duren, Germany). După legare și spălare cu apă MilliQ (de 5 ori volumul patului cromatografic din cartuș), metaboliții au fost eluați cu metanol (de 2 ori volumul patului cromatografic din cartuș), uscați sub vacuum și resuspendați în 100 μl de metanol. Probele normalizate au fost analizate prin cromatografie de înaltă presiune în fază inversă, folosind o coloană Zorbax C18, de 4,6 mm diametru și 150 mm lungime, montată pe un sistem 1290 Infinity LC (Agilent, Palo Alto, SUA, cu detector cu lanț de diode - „diode

RO 126362 B1

array"), cuplat cu un spectrometru de masă Agilent 5230 Accurate TOF LC/MS. Lipopetidele au fost eluate în gradient, folosind soluții de 0,05% acid trifluoroacetic în acetonitril și în apă milliQ, cu un debit de 1 ml/min. Lungimea de undă pentru detecția eluatelor a fost stabilită la 280 nm, iar temperatura coloanei a fost menținută la 25°C.

Policetidele au fost eluate într-un sistem de solvenți binar (solvent A: 0,1% formic acid în apă milliQ; solvent B: 0,1% acid formic în acetonitril), după cum urmează: 30% B pentru 5 min, urmat de 5 min gradient de la 30% B la 45% B și un gradient subsecvent de 25 min de la 45% B la 100% B. Debitul a fost de 0,5 ml/min la 40°C. Identitatea fiecărui metabolit a fost obținută pe baza masei moleculare a ionilor moleculari detectați prin spectrometrie de masă, folosind următoarele condiții de ionizare (atât în modul pozitiv, cât și în cel negativ) temperatura sursei: 150°C; temperatura de desolvatare: 325°C; debit azot: 550 l/min; voltajul conului: 80 V.

În supernatantul culturilor de 12 h, pe mediu Landy, au fost puse în evidență picuri care aparțin următoarelor clase de antibiotice policetide: macrolactină; bacilenă, clorotetaină (tabelul 8). În cazul probelor provenite din culturii de 72 h, au fost detectate trei grupe picuri distincte de antibiotice lipopeptidice, care au fost identificate ca fiind din clasa surfactină, fengicină și iturină (tabelul 8).

Tabelul 8

Metaboliții produși de tulpina Bacillus amyloliquefaciens B165, cultivată pe mediu Landy

Metabolit	Picul de masă observat	Identificare
Policetide		
Macrolactină	425.4 [M+Na] ⁺	Macrolactin A
	511.4 [M+Na] ⁺	7-o-malonyl macrolactin A
	525.4 [M+Na] ⁺	7-o-succinyl macrolactin A
	629.3 [M+H-H ₂ O] ⁺	Macrolactin D
Bacilenă	583.5 [M+H] ⁺	Bacillaene A
	605.5 [M+Na] ⁺	Bacillaene B
Clorotetaină	289.2 [M+H] ⁺	Chlorotetaine (³⁵ Cl)
	291.1 [M+H] ⁺	Chlorotetaine (³⁷ Cl)
Lipopeptide		
Surfactină	1044.8, 1060.8 [M+Na, K] ⁺	C14-surfactin
	1058.8, 1074.8 [M+Na, K] ⁺	C15-surfactin
Fengicină	1471.9, 1487.9 [M+Na, K] ⁺	Ala-6 C15-fengycin
	1485.9, 1501.9 [M+Na, K] ⁺	Ala-6 C16-fengycin
	1499.9, 1515.9 [M+Na, K] ⁺	Ala-6 C17-fengycin
	1513.9, 1529.9 [M+Na, K] ⁺	Val-6 C16-fengycin
	1527.8, 1543.8 [M+Na, K] ⁺	Val-6 C17-fengycin
Iturină A	1066.1 [M+Na] ⁺	C14-iturin A
	1079.7 [M+Na] ⁺	C15-iturin A

RO 126362 B1

1 Antibioticele produse de tulpina B165 își exercită acțiunea de protecție împotriva
patogenilor plantelor de cultură atât pe cale directă, prin inhibarea dezvoltării fitopatogenilor,
3 cât și indirect, prin activarea sistemului de apărare din plante (Ongena et al., 2007,
Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced
5 ***systemic resistance in plants***, Environ. Microb., 9, 1084-1090).

În cadrul unui alt experiment, a fost testată activitatea biosurfactantă a tulpinii *B.*
7 *amyloliquefaciens* B165. Biosurfactanții produși de către antagoniștii din genul *Bacillus* sunt
cei printre cei mai cunoscuți pentru proprietățile antagoniste, dar aceștia joacă un rol
9 important și în mobilitatea bacteriilor. Activitatea biosurfactantă a tulpinii B165 a fost testată
în supernatantul liber de celule bacteriene nediluat, diluat de 5x și de 10x. Pentru aceasta,
11 tulpina a fost inoculată în 10 ml mediu Luria Bertani (LB) și în mediul optimizat Jacques;
mediile inoculate au fost incubate 18 h la 150 rpm și 37°C. Supernatantul din cele două medii
13 de creștere a fost colectat și s-au făcut diluții. Tensiunea superficială a fost măsurată cu un
inel Du Nouy (K6 Kruss, GmbH, Hamburg, Germania) (Kuiper et al., 2004).

În ambele medii de creștere, s-au înregistrat curbe similare ale tensiunii superficiale,
dar în mediul optimizat, tulpina a menținut o tensiune mai mare la diluții mai mari comparativ
17 cu mediul LB; acest fapt demonstrează și, pe această cale, producerea de antibiotice de
către tulpina B165, care-și exprimă la un nivel superior genele pentru sinteza antibioticelor
19 lipopetidice biosurfactante în mediul optimizat Jacques.

În alte experimente, s-a realizat testarea mobilității tulpinii B165. Mobilitatea joacă un
21 rol major în colonizarea rădăcinilor plantelor și este factorul direct implicat în mecanismul de
combatere biologică prin competiție pentru nutrienți și spațiu. *Bacillus subtilis* B165 a fost
23 testat pentru mobilitatea de migrare la suprafața agarului (swimming) și de agregare ca
urmare a chemotaxiei (swarming), împreună cu o tulpină martor cunoscută ca fiind nemobilă,
25 *P. putida* PCL1760.

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

Tulpina B165 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. amyloliquefaciens* B165 a fost
31 detectată printr-o metodă colorimetrică specifică pentru compușii indolici. Pe scurt, patru
tulpini de *B. amyloliquefaciens* au fost inoculate în mediul nutrient broth (NB: peptonă 5 g;
33 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
35 centrifugați la 13.000 rpm, timp de 10 min. Doi mililitri din supernatant au fost transferați într-
un tub nou, în care s-au adăugat 100 μl 10 mM acid ortofosforic și 4 ml reactiv Salkowski
37 (2% soluție FeCl₃ 0,5 M în 35% acid percloric). Absorbanta a fost citită la 530 nm, după
39 menținerea tuburilor pentru 30 min la temperatura camerei.

Atunci când compușii auxinici sunt produși în mediu, adăugarea reactivului Salkowski
41 determină virarea culorii către roz. Concentrația acidului indolil 3 acetic (IAA) în culturile
studiate s-a determinat prin utilizarea unei curbe standard, realizată cu concentrații diferite
43 de auxină. Toate tulpinile analizate au atins faza staționară de creștere în 24 h, dar la acel
moment, nu s-a detectat auxină în mediile de cultură. După 8 zile de cultivare în mediul NB,
45 cu și fără triptofan, toate tulpinile cercetate au produs auxină (tabelul 9). Toate tulpinile de
Bacillus testate au răspuns pozitiv la prezența triptofanului în mediu, iar cea mai mare
47 cantitate de auxină a fost produsă de tulpina B165 (6,64 μg/ml și 8,4 μg/ml fără și, respectiv,
cu triptofan). Cantitatea de auxină produsă de către toate izolatele testate a variat între 6 și
49 7,15 μg/ml (NB fără triptofan) și 7,64...8,72 μg/ml cu triptofan (NB suplimentat cu triptofan,
100 μg/ml mediu).

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

Mediu de cultură	Bsal2	B165	Bc1c	B30
Nutrient broth (peptonă 5 g; extract drojdie 1,5 g, extract carne 1,5 g, NaCl 5 g) fără triptofan (100 Mg/ml)	0,150 (6 Mg/ml)	0,182 (7,15 µg/ml)	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)	0,218 (8,72 µg/ml)	0,197 (7,88 µg/ml)	0,191 (7,64 µg/ml)

*Valorile reprezintă absorbanta, 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).

Pentru evidențierea efectului fitostimulator al al tulpinii B165, s-a realizat și un experiment *in vitro* (tabelul 10). Semințele de rapiță (cv. Triangle) și achenele de floarea-soarelui (cv. Rigasol OR) au fost sterilizate la suprafață prin metoda descrisă de Dobbelaere et al. (1999), prin spălări repetate cu Domestos (Unilever South-East Europe) și clătiri cu apă distilată. Semințele/achenele astfel dezinfectate au fost plasate pe discuri de hârtie de filtru sterile (depusă în plăci Petri (J) 9 cm) și umectate cu 1,5 ml de apă sterilă.

Tabelul 10

Efectul fitostimulator *in vitro* al tulpinilor bacteriene testate

Varianta experimentală	Lungime rădăcini* (cm)	
	Rapiță cv. Triangle	Floarea-soarelui cv. Rigasol OR
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp007	6,47 ± 1,42 a	6,67 ± 1,17 ab
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B165	4,74 ± 1,22 b	7,21 ± 0,93 a
Martor - tampon fosfat	2,67 ± 0,42 c	3,32 ± 0,64 c
Martor netratat - apă sterilă	2,82 ± 0,58 c	3,61 ± 0,72 c

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ statistic pentru p<0,05

După 24 h de incubare la întuneric la 25°C, semințele/achenele au fost inoculate cu 0,1 ml suspensie de bacterii în tampon fosfat salin steril. Martorul a fost tratat cu tampon fosfat steril. După 72 h de incubare la întuneric, a fost măsurată lungimea rădăcinilor. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 9, față de o tulpină etalon recunoscută pentru activitatea sa fitostimulatoare (*Azospirillum brasilense* Sp007). Aceste rezultate dovedesc un efect stimulator semnificativ al tulpinei B165, mai ales asupra plantelor de floarea-soarelui.

Tulpina B165 a fost caracterizată și în ceea ce privește producerea unor exoenzime hidrolitice. Chitinaza și proteaza au un rol în antagonism prin degradarea peretelui celulelor fungice, amilaza, celulaza și fitaza sunt importante pentru colonizarea rădăcinilor plantelor și/sau mineralizarea materialului vegetal, iar lactonaza acționează asupra fitopatogenilor gram-negativi care utilizează acil-homoserin-lactona (AHL) ca semnal implicat în sensibilitatea de grup (*quorum sensing*).

RO 126362 B1

1 Testul pentru producerea de proteaze a fost efectuat pe mediul Bazal (BM; Meyer
and Abdallah, 1978) agarizat completat cu lapte smântânit 5%. Tulpina B165 a fost inoculată
3 prin înțeparea mediului, după care plăcile au fost incubate la 28°C. După 5 zile, acestea au
fost analizate pentru prezența zonelor clare în jurul locului de inoculare, acestea indicând
5 producerea de proteaze.

Activitatea celulazică a fost determinată prin descompunerea substratului carboxi-
7 metil-celuloză. Tulpina B165 a fost însămânțată pe plăci cu mediu minimal agarizat care, în
partea superioară, s-au acoperit cu un strat de agar + 1% carboxi-metil-celuloză. După 5 zile
9 de incubare la 28°C, plăcile au fost colorate, pentru 30 min, cu 0,3% roșu de Congo. Ulterior,
acestea au fost clătite cu apă de robinet, iar colorantul a fost fixat prin incubare pentru
11 15 min, cu 10% acid acetic. Prezența unei zone clare a indicat producerea de celuloze.

Producerea de chitinaze a fost analizată prin descompunerea substratului CM-chitin-
13 RBV (Carboxi-metil-chitină cuplată cu Remazol Brilliant Violet, Loewe Biochemica GmbH,
Germania). B165 a fost însămânțată pe plăci cu mediu BM agarizat, care în partea
15 superioară s-au acoperit cu un strat de agar + 50% (v/v) CM-Chitin-RBV ca sursă de carbon.
După 5 zile, acestea au fost analizate pentru prezența zonelor clare în jurul locului de
17 inoculare, acestea indicând producerea de chitinaze.

Tulpinile au fost analizate în ceea ce privește producerea de amilază, prin însămân-
19 țarea sub formă de striu pe mediul nutrient agar (NA) + 0,4% amidon solubil. Plăcile au fost
incubate la 28°C, timp de 48...72 h, după care s-au tratat cu soluție de iod în iodură de
21 potasiu, prin inundare. Zonele clare din jurul creșterii bacteriene, după adăugarea soluției de
iod, au indicat descompunerea amidonului din mediu și, deci, producerea de amilază.

Pentru evidențierea activității fitazice, bacteriile au fost inoculate pe un mediu cu
23 următoarea compoziție: 0,5% glucoză; 0,5% NH₄NO₃; 0,05% KCl; 0,05% MgSO₄·7H₂O;
25 0,001% FeSO₄·7H₂O; 0,001% MnSO₄·7H₂O; 0,05% fitat de calciu, 2% agar, pH ajustat la 5,5.
Fitaza produsă de bacterii solubiliza fitatul de calciu și producea un halou în jurul zonei de
27 creștere.

Producerea de lactonază de către B165 a fost analizată prin inocularea a 2 ml de LB
29 suplimentat cu 5 μM C6-hexanoil-homoserin-lactonă (C6-HHL) și crescut peste noapte la
28°C și agitare 150 rpm/min. A fost folosit un martor negativ, reprezentat de un mediu
31 neinoculat care a fost incubat în aceleași condiții, pentru a verifica dacă se produce lactoliză.
Plăci Petri cu mediul LB + 50 μg/ml Km au fost însămânțate cu tulpina biosenzor Cv026 de
33 *Chromobacterium violaceum* (transformată să nu producă N-acil homoserin lactonă).
Godeuri tăiate (5 mm φ) în mediul inoculat în plaja cu Cv06 au fost umplute cu 100 μl din
35 cultura de B165. Plăcile au fost incubate peste noapte la 28°C și analizate pentru
prezența/absența halourilor violacee în jurul godeurilor inoculate cu bacteria. Absența culorii
37 a indicat faptul că toată C6-HHL a fost degradată și deci producerea de lactonază.

Rezultatele au demonstrat ca tulpina B165 produce amilază, fitază, celuloză protează
39 și lactonază, dar nu produce chitinază.

Pentru evidențierea capacității de degradare a materialului vegetal, s-a realizat un
41 experiment prin care s-a urmărit producerea de bioxid de carbon din material vegetal tratat
cu diferite tulpini de *Bacillus*. Materialul vegetal (paie de grâu) a fost măcinat și trecut pe sita
43 de 0,250 mm. S-au luat 0,1 g de pulbere, care s-au adus aseptice într-un erlenmeyer de
50 ml, steril. Peste pulberea fin măcinată, se adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. S-a
45 omogenizat prin agitare și s-a inoculat apoi cu 1 ml suspensie bacteriană, provenită din
cultură de 12 h pe mediu LB, normalizată la 10⁸ ufc/ml. S-a menținut la agitator timp de 24 h,
47 la temperatura de 28°C, după care s-a trecut aseptice într-un vas de respirație Strathox
(Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie). S-au efectuat determinările de

RO 126362 B1

respirație/producere de bioxid de carbon timp de 12 h. După efectuarea determinărilor de respirație, s-au separat prin filtrare supernatantele, în care s-a determinat Carbonul Organic Total (TOC) cu un aparat Formacs HT (Skalar Analytical B.V., Breda Olanda).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 11. Aceste rezultate demonstrează existența unei activități ridicate de hidroliză a materialului vegetal de către tulpina B165 de *Bacillus amyloliquefaciens*. Datorită faptului că prezintă un spectru larg de acțiune antifungică față de ciupercile de sol fitopatogene, o capacitate semnificativă de stimulare a creșterii plantelor și o activitate mărită de producere a unor exohidrolaze implicate în mineralizarea materialului vegetal, tulpina *B. amyloliquefaciens* B165 prezintă complementaritate cu tehnologiile agricole conservative. În aceste tipuri de tehnologii, sunt reduse lucrările solului și se menține peste 30% din teren acoperit cu resturi vegetale. În aceste condiții, semințele plantelor de cultură germinează mai greu și este creat un cadru favorabil atacului agenților fitopatogeni. Aplicarea tulpinii B165 peste resturile vegetale compensează aceste dezavantaje ale tehnologiilor agricole conservative.

Tabelul 11

Activitatea de degradare a materialului vegetal de către tulpinele de *Bacillus* testate

Tulpina	Respirație (mg CO ₂ produși, medie orară)	Conținut de carbon organic total în supernatant (mcg/l)
<i>Bacillus subtilis</i> Bs30	1,87±0,36	25,24±3,52
<i>Bacillus subtilis</i> B49b	2,24±0,28	47,87±4,17
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B165	12,64±0,41	216,54 ±8,25

Pentru a se verifica interacția tulpinii B165 cu materialul vegetal și cu plantele de cultură, a fost realizat un experiment în seră, în care au fost cultivate plante de floarea-soarelui (cv. Rigasol OR) în ghivece de 20 cm diametru și 25 cm înălțime. Substratul utilizat în seră pentru creșterea plantelor a constat din 1/2 pământ de grădină + 1/4 mranită + 1/4 nisip. Acesta a fost amestecat uniform, afânat și apoi distribuit în ghivece cu 48 h înainte de semănat.

Suprafața substratului de creștere din ghivece a fost acoperit cu un strat uniform de mulci vegetal de 1 cm grosime, rezultat prin distribuirea pe sol a unei pulberi rezultate din tocarea grosieră a unor plante de 40 zile de mazărice păroasă (*Vicia villosa*).

Achenele de floarea-soarelui au fost semănate la o adâncime de 5 cm, într-o gaură practică în mulciul vegetal și în substratul de cultură. S-au acoperit semințele cu substrat de cultură și cu mulci vegetal și apoi s-a tratat materialul vegetal cu diferite tulpini de bacterii, cu activitate antagonică și/sau stimulantă dovedită.

Materialul vegetal a fost tratat prin stropire cu o suspensie bacterienă al cărei titru a fost stabilit la 10⁸ ufc/ml. S-au aplicat câte 5 ml pentru fiecare ghiveci. S-a lucrat în 5 repetiții, față de o variantă martor netratată. Ghivecele s-au menținut 5 săptămâni la 20 ± 2°C, condiții naturale de iluminare de seră, în cursul lunilor aprilie-mai. După 5 săptămâni, s-au determinat o serie de indici morfometrici (înălțimea plantelor, diametrul la colet). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 12; aceste rezultate demonstrează un efect stimulator distinct semnificativ al tulpinii de B165, în condițiile experimentale date.

Influența tratării mulciului vegetal de mazărice păroasă (*Vicia villosa*) cu diferite tulpini de bacterii asupra dezvoltării plantelor de floarea-soarelui (cv. Rigasol OR), însămânțate în mulciul vegetal tratat

Varianta	Înălțimea plantei (cm)	Diametrul la colet (cm)
Martor netratat	52,5 ± 4,72b	3,7 ± 0,58
<i>Bacillus subtilis</i> B49b	56 ± 7,27b	3,75 ± 0,61
<i>Azospirillum brasiliense</i> Sp001	67,5 ± 6,53ab	4,24 ± 0,42
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B165	74,2 ± 9,72a	3,78 ± 0,35

În concluzie, tulpina B165 a demonstrat că are calități de agent de combatere biologică față de un număr mare de ciuperci fitopatogene de sol, activitate de stimulare a creșterii plantelor și de mineralizare a materialului vegetal.

Tulpina B165 produce antibiotice lipopolipeptidice și policetidice, cu acțiune de inhibare a dezvoltării ciupercilor fitopatogene. De asemenea, tulpina B165 produce protează și lactonază, enzime care joacă un rol important în stoparea/inhibarea unor mecanisme care stau la baza fitopatogenității unor microorganisme. *B. amyloliquefaciens* B165 a dovedit ca este mobil pe medii (semi)agarizate, proprietate care poate fi corelată cu producerea de surfactină și protează.

Tulpina B165 are capacitatea de a transforma precursorii aminoacizi (triptofan) în fitohormoni auxinici și are activitate de stimulare a creșterii plantelor. De asemenea, tulpina B165 sintetizează exohidrolaze care sunt active în degradarea și mineralizarea materialului vegetal.

Utilizarea tulpinii *B. amyloliquefaciens* B165 (număr de depozit NCAIM (P) B001363), ca bioinoculant, reprezintă o soluție alternativă la utilizarea pesticidelor în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol, în special, în condițiile tehnologiilor agricole conservative.

RO 126362 B1

Revendicare

1

Tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens*, codificată B165, cu număr de depozit NCAIM (P) B0013603, antagonistă față de ciuperci fitopatogene din resturi vegetale *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum* f. *sp. radicle-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*, datorită producerii de antibiotice lipopeptidice și policetidice, și de enzime hidrolitice, protează și lactonază, și care are și o activitate de stimulare a creșterii plantelor, datorită producerii endofite de auxine, și capacitate de mineralizare a materialului vegetal, datorită producerii de amilază, fitază și celulază. 3 5 7 9



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 772/2013