



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01158**

(22) Data de depozit: **24.11.2010**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:
• **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;

• **DINU SORINA,**
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CONSTANTINESCU FLORICA,**
STR. EMANOIL PORUMBARU NR. 67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **OANA SICUIA, STR. VICINA NR.3, BL.33,**
SC.3, AP.153, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **TULPINA DE *BACILLUS SUBTILIS* CU ACTIVITATE DE
COMBATERE A AGENȚILOR FITOPATOGENI DIN SOL,
STIMULARE A CREȘTERII PLANTELOR ȘI BIODEGRADARE
CONTROLATĂ A MATERIALULUI VEGETAL**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Bacillus subtilis* Usa2, număr de depozit DSMZ 23654, pentru combaterea agenților patogeni din sol, stimularea creșterii plantelor și biodegradarea controlată a materialului vegetal din cadrul sistemelor de agricultură conservativă, care exercită acțiuni benefice asupra plantelor de cultură, datorită activității de protecție față de ciuperci fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora debaryanum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp.*

radicis-lycopersici, *Sclerotium bataticola*, a producerii *in situ* de factori de creștere pentru plante și a capacității de degradare controlată a materialului vegetal, cu formare de poliamine, compuși care cresc rezistența plantelor la stresurile biotice și abiotice. Aceste acțiuni benefice se concretizează prin sporuri de producție la floarea-soarelui, realizate în condițiile unui sistem agricol conservativ, în care sunt reduse costurile de producție aferente folosirii erbicidelor și arăturii.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



12

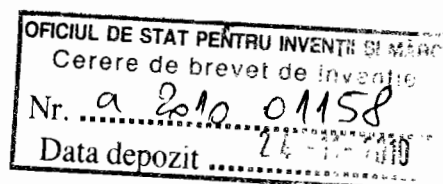
TULPINA DE *BACILLUS SUBTILIS* CU ACTIVITATE DE COMBATERE A AGENȚILOR FITOPATOGENI DIN SOL, STIMULARE A CREȘTERII PLANTELOR ȘI BIODEGRADARE CONTROLATĂ A MATERIALULUI VEGETAL

Prezenta invenție se referă la o nouă tulpină de *Bacillus subtilis*, care este destinată combaterii agenților fitopatogeni din sol, stimulării creșterii plantelor și biodegradării controlate a materialului vegetal în cadrul sistemelor de agricultură conservativă, inclusiv a celor pe bază de mulci vegetal provenit din culturi verzi de protecție.

Sunt cunoscute mai multe tulpini de *Bacillus subtilis* care au activitate de combatere a agenților fitopatogeni. Brevetul WO 2007/043771 se referă la compoziții pentru prevenirea bolilor plantelor pe baza tulpinilor KCCM 10639 sau KCCM 10640 de *B. subtilis* și un procedeu de aplicare a acestor compoziții. O serie de brevete SUA (6 060 051, 6 103 228, 6 291 426 și 6 417 163) protejează tulpina AQ / QST 713 de *B. subtilis* (cu număr de depozit NRRL BO-21661) care este înalt producătoare de antibiotice și cu un spectru larg de activitate insecticidă, antifungică și antibacteriană.

De asemenea au fost descrise până în prezent mai multe tulpini de *Bacillus subtilis* care au concomitent activitate de combatere a agenților fitopatogeni și de stimulare a creșterii plantelor. Cererea de brevet SUA 2008/0152684 descrie o tulpină de *B. subtilis* WG6-14 (număr de depozit NRRL B-30954), care prezintă atât activitate de stimulare a creșterii plantelor (datorită producerii de metaboliți volatili, ca de ex. acetoină și 2,3 butandiol) cât și activitate antagonistă față de ciuperci fitopatogene (*Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Sclerotium rolfsii*) și față de bacterii fitopatogene (*Xanthomonas axenopodis* pv. *citri*, *X. axenopodis* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Brevetul SUA 7 211 428 expune o tulpină de *B. subtilis* (număr de depozit MTTC 5130) cu caracteristici de inhibarea a creșterii ciupercilor patogene (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Pythium aphanidermatum*, *Curvularia andropogonis*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Thielavia basicola*) și care stimulează dezvoltarea plantelor de cultură (de geranium și piretru).

Nu s-au descris până în prezent tulpini de *Bacillus subtilis* care să aibă concomitent activitate de antagonism față de agenții fitopatogeni din sol, de stimulare a creșterii plantelor și de biodegradare controlată a materialului vegetal. Astfel de tulpini sunt necesare sistemelor de agricultură conservativă. În cadrul acestor sisteme lucrările mecanice ale solului sunt reduse, iar solul este acoperit



cu cel puțin 30% resturi vegetale. Sistemele de agricultură conservativă reduc eroziunea solului, și poluarea apelor, de suprafață și din pânza freatică, dar au dezavantajul că mențin solul rece, reducând germinația și dezvoltarea plantelor cultivate, și favorizând dezvoltarea agenților de dăunare, în special ciuperci fitopatogene cu spectru larg de acțiune.

În cadrul acestor sisteme de agricultură conservativă tulpinile de *Bacillus subtilis* care prezintă concomitent activitate de antagonism față de agenții fitopatogeni din sol, de stimulare a creșterii plantelor și de biodegradare controlată a materialului vegetal ar contribui la înlăturarea dezavantajului menționat mai sus, pentru că ar inhiba agenți fitopatogeni din sol, ar stimula dezvoltarea plantelor de cultură și ar asigura un management durabil al resturilor vegetale.

Tulpina *B. subtilis* Usa2 (număr de depozit DSMZ 23654) prezintă un spectru larg de acțiune antifungică față de ciupercile de sol fitopatogene, o activitate de stimulare a creșterii plantelor și de biodegradare controlată a materialului vegetal.

Tulpina *B. subtilis* Usa2 prezintă următoarele avantaje:

- creștere bogată pe mediile uzuale utilizate pentru creșterea bacililor gram pozitivi sporulați;
- formarea de spori cu viabilitate îndelungată;
- capacitate de a modula formarea consorțiilor microbiene de consens cu alte bacterii utilizate în biopreparate mixte datorită activității lactonazice prin care influențează semnalele AHL implicate în realizarea sensibilității de grup;
- spectru larg de acțiune împotriva atacului ciupercilor fitopatogene de sol;
- stimularea creșterii plantelor de cultură
- biodegradare controlată a materialului vegetal, cu formare de compuși care cresc rezistența plantelor la stress-urile biotice și abiotice de tipul poliaminelor.

Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos.

Exemplu. Tulpina Usa2 de *Bacillus subtilis* a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, din rizosfera unei plante de usturoi provenita din zona de sud a Olteniei. Pentru izolarea bacteriei s-a utilizat agar nutritiv (peptona – 5g/l, extract de carne – 3g/l, agar – 20g/l, la 1000 ml apa; pH 6.8-7.2), iar pentru cultivare s-a utilizat mediul Luria-Bertani agarizat (LBA: bacto-triptona – 10g/l, extract de drojdie – 5g/l, NaCl – 10g/l, agar – 20g/l, la 1000 ml apa; pH 7.5.), la o temperatura optima de incubare de 28°C.

Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 150 izolate de bacili sporulanți gram-pozitivi. În vederea încadrării taxonomice, tulpina Usa2 a fost



caracterizată pe baza unei taxonomii polifazice, respectiv a combinării caracterelor morfologice (tab. 1), cu cele fiziologice (tab. 2) și cu cele moleculare (secvența 16S rADN, tab. 3).

Tab. 1. Morfologia coloniilor de *Bacillus subtilis* Usa2 pe diferite medii după cultivare timp de 24 ore.

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii Usa2		
		culoare	aspect exterior	dimensiuni (24h)
Medii gelificate semi-sintetice	mediul cu decoct de cartof - glucoza - agar (CGA)	brune	rugoase, margini neregulate sub forma de filamente	colonii mari
	mediu cu extract de carne (beef extract)	crem	rugoase, centrul proeminent, încrețit, margini neregulate	colonii mari
	mediul cu decoct de fasole	crem-brun	rugoase, margini neregulate	colonii medii
	mediul 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	mediul cu decoct de cartof - glucoza	-	peliculă fină la suprafața, rugoasă, turbiditate slabă	-
	mediu cu extract de carne	-	peliculă fină la suprafața, rugoasă, turbiditate slabă	-

Tab. 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii Usa2.

Testul biochimic	Usa2
Reactia Gram	+
Reactia Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Reducerea NO ₃ →NO ₂	+
Crestere anaeroba	-
Catalaza	+
Sursa de carbon:	
malonat	+
citrat	+
propionat	-
tartrat	+
trehaloza	+
glucoza	+
Acidifica:	
xiloza	+
glucoza	+
arabinoza	±
manitol	+
rafinoza	+
celobioza	+
Toleranta la NaCl 7%	+

[Signature]

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN (tab.3) 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; amplificare enzimatică a acizilor nucleici înainte de secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-ului codificând pentru 16sRNA. 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).

Tab. 3. Identificarea tulpinii pe baza similarității secvenței 16 S rADN cu tulpinile din GenBank

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN ¹	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinii ²
Usa2	510	GCGGACAGAATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGG GATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT GAACCGCATGGTTC AACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCA CTTACAGATGGACCCGCAACGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGA AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTT CGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGC CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG	<i>Bacillus subtilis</i> strain ZHB4 (FJ263016.1) - similaritate: 99,4%

Coroborând toate datele obținute, tulpina Usa2 a fost încadrată ca aparținând speciei *Bacillus subtilis*. Încadrarea taxonomică a tulpinii Usa₂ a fost confirmată de specialiștii de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - Centrul german de microorganisme și culturi celulare) și depozitată în vederea brevetării (DSM 23654).

Selecția tulpinii usa2 s-a realizat pe baza acțiunii benefice exercitate asupra diferitelor plante de cultură (grâu, porumb, floarea-soarelui) datorită activității de protecție față de ciupercile fitopatogene de sol (*Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Pythium debaryanum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. radicum-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*), producerii *in situ* de factori de creștere pentru plante și capacității de



degradare controlată a materialului vegetal cu formare de poliamine, compuși care cresc rezistența plantelor la stress-urile biotice și abiotice.

Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii Usa2 a fost efectuată pe mediul cu cartof - glucoza - agar (CGA/PDA) utilizându-se metoda culturilor duble. Tulpina Usa2 (dintr-o cultura de 24 ore de creștere pe mediul LBA) a fost însămânțată în placi petri prin strierea cu anșa a unei linii drepte la o distanță de 3 cm de o rondea calibrată de miceliu (5mm) din cele 11 ciuperci testate. Plăcile Petri astfel însămânțate au fost incubate la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 72 ore. Experiența a fost repetată de trei ori. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.

Tab. 4. Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii Usa2 de *B. subtilis* asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h incubare la 28°C).

Cod tulpina - Incadrare taxonomica	Ciuperca fitopatogenă *										
	Fg	Alt	Bc	Ss	Sc	Gg	Pdb	Vd	Rs	Forl	Sb
	Zona de inhibiție (mm)										
Usa ₂ – <i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	++

Legenda: +++ = zona de inhibiție > 5mm; ++ = zona de inhibiție > 3 mm; + = creștere limitată; *Fg=*Fusarium graminearum*, Alt=*Alternaria spp*, Bc=*Botrytis cinerea*, Ss=*Sclerotinia sclerotiorum*, Sc=*Sclerotium cepivorum*, Gg=*Gaeumannomyces graminis*, Pdb=*Pythium debaryanum*, Vd=*Verticillium dahliae*, Rs=*Rhizoctonia solani*, Forl =*Fusarium oxisporum f. sp. radialis-lycopersici* și Sb=*Sclerotium bataticola*

Testele efectuate *in vitro* față de diferite ciuperci fitopatogene au evidențiat un spectru larg de acțiune antifungică, tulpina Usa2 putând fi astfel utilizată pentru protecția diferitelor culturi amplasate în mulci bioactiv provenit din cultura de mazăre / mazărice de toamnă.

Activitatea biologică *in vivo* a fost testată în condiții de seră, în ceea ce privește eficacitatea tulpinii Usa2 în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxisporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*), care atacă frecvent în stadiul de plantulă și produc pagube.

Operațiunile implicate au constat în pregătirea inoculului bacterian prin înmprospătarea în eprubete (incubate la 27°C timp de 2-3 zile) pe mediul cartof-glucoza-agar (CGA) și realizarea suspensiilor bacteriene în tampon fosfat cu titrul de 10⁸ ufc/ml. Inoculul fungic s-a obținut în placi Roux, pe mediul natural alcătuit din boabe de ovăz dublu sterilizate la 1 atm. timp de 20 minute, 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 ($\sim 2 \times 10^6$ spori/kg sol) și apoi distribuit în tăvi din plastic (32/24 cm) cu 48 ore înainte de semănat.

Materialul vegetal (achene de floarea soarelui cv. Favorit) a fost tratat înainte de semănat prin imersie, timp de 20 minute, în suspensiile bacteriene ale căror titru a fost stabilit la 10^8 ufc/ml. Inocul de fitopatogen aplicat la floarea-soarelui a constat în complexul *R. solani* + *F. oxysporum* + *P. de baryanum* (RFP), *S. sclerotiorum* și *S. bataticola*.

Experimentul a fost analizat după 3 săptămâni de la semănat în ceea ce privește eficacitatea tulpinilor în combaterea ciupercilor fitopatogene. Calculul analizei varianței s-a efectuat cu programul ANOVA.

Calculul eficacității (%) tratamentelor cu microorganisme utile la sămânța de floarea-soarelui (cv. Favorit), în prevenirea atacului ciupercilor de sol luate în studiu, a reflectat o foarte bună eficacitate a tulpinii de *Bacillus subtilis* Usa2, uneori peste etalonul chimic pe bază de tiuram (tab. 5).

Tab. 5. Eficacitatea diferitelor tulpini de microorganisme antagoniste în prevenirea atacului unor ciuperci telurice la cultura florii soarelui (cv. Favorit) în condiții de seră.

Inocul fungic*	R.F.P.*		S. s.		S.b.	
	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)
77.3	83	64	90	78	80	60
Td67	80	57	83	62	79	58
Usa ₂	99	98	97	93	99	98
Bs36	73	43	81	58	77	54
56.1s	75	47	85	67	80	60
Bs 48	71	38	81	58	98	56
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*.

În variantele infectate cu complexul R.F.P. cea mai mare eficacitate (> 50%) s-a obținut în cazul tratării semințelor cu tulpinile Usa₂, 56.1s și 77.3. Tratamentele



chimice cu Tiradin 70 PU (4g/kg semințe) au avut valori ale eficacității 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*. Tulpinile Usa₂ au avut o eficacitate de combatere a atacului ciupercilor fitopatogene de sol în amestec, *R. solani* + *F. oxysporum* + *P. de baryanum*, superioară matorului chimic etalon.

Evidențierea producerii de lactonază s-a realizat printr-un experiment în trepte. Numeroase bacterii Gram-negative patogene utilizează acil-homoserin-lactona (AHL) pentru expresia sensibilității de grup (*quorum sensing*). O enzimă denumită AHL-lactonaza produsă de numeroase tulpini de *Bacillus* sp. este capabilă să hidrolizeze inelul moleculei de homoserin-lactona interferând astfel cu sistemul de comunicare al acestor bacterii (*quorum quencing*). Tulpina biosenzor de *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan *et al.*, 1997) a fost utilizată ca indicator. Testul propriu-zis a constat în inocularea tulpinii Usa₂ în 2 ml mediu lichid Luria Bertani în care s-a adăugat C6-hexanoil-homoserin-lactonă (C6-HHL) în concentrație finală de 5 μM și incubarea peste noapte la 28°C cu agitare la 150 rpm. Simultan, același mediu numai cu C6-HHL a fost utilizat ca martor negativ pentru a vedea dacă mediul induce lactoliza. Testul a fost efectuat pe plăci Petri cu mediul LBA (Luria Bertani cu agar) suplimentat cu 50 μg/ml kanamicină și inoculat în plaja cu CV026 prin distribuția sub formă de plaja a unei cantități de 250 μl dintr-o cultură de 12 ore. Pe suprafața plăcii astfel inoculate au fost efectuate godeuri cu diametrul de 5 mm în care s-au distribuit 100 μl din supernatantul culturii bacteriene de testat. Petriurile au fost incubate peste noapte la 28°C și, ulterior analizate pentru prezența/absența halourilor violete. Absența halourilor violete a indicat faptul că, tot C6-HHL din mediul de creștere a fost degradat.

Tulpina Usa₂ prezintă capacitate foarte ridicată de producere de lactonază, modulând comunicarea la nivel de grup a altor bacterii. Poate fi deci folosită pentru combaterea bacteriilor fitopatogene care utilizează C6-HHL sau pentru realizarea de consorții microbiene de consens în care este necesară modularea *quorum sensing*.

Următoarea serie de experimente a urmărit punerea în evidență a acțiunii de favorizare a creșterii și dezvoltării vegetale datorate producerii de fitohormoni *in situ* de către microorganismul în discuție. S-a urmărit evidențierea activității fitohormonilor giberelici produși de bacteriile gram pozitive sporulate, utile plantelor de cultura, pentru a se verifica calitatea biologică de favorizant de creștere.

Evidențierea și estimarea activității fitohormonilor giberelinici s-a efectuat prin biotestul inducerii α-amilazei din endospermul de orz cuplat cu tehnica difuziei radiale în gel. Etapele procedurii utilizate au fost:



- inducerea biosintezei α -amilazei in endospermul boabelor de orz de către fitohormonii prezenți in extractele de testat;
- difuzia radiala in gelul de agar-amidon a enzimelor sintetizate sub acțiunea fitohormonilor si hidroliza consecutiva a amidonului;
- evidențierea zonei de acțiune a enzimei prin colorarea substratului.

Reactivi folosiți in cadrul acestui test au fost:

Gel de agar - amidon. In 100 ml tampon substrat pH 6,9 diluat cu 100 ml apa s-au dizolvat la cald 2,5 g agar si 1 g de amidon; s-a fiert pana a devenit limpede.

Soluție tampon substrat pH 6,9; 590 mg acetat de sodiu + 1,47 g veronal sodic + 1,4 g NaCl + 780 mg CaCl₂ s-au dizolvat in apa distilata si apoi s-au adăugat 62 ml HCl 0,1 N si s-a adus la un volum final de 250 ml cu apa distilata.

Soluție de dezvoltare: 45 ml iod 0,1 N cu 55 ml etanol absolut

Extract de biopreparat realizat prin osmoza inversa.

Endosperm de orz. Boabe de orz s-au curtat de palee si li s-a înlăturat prin taiere partea care conține embrionul.

Modul de lucru a implicat următoarele etape:

- depunerea unui gel de agar - amidon în grosime de 2-3 mm pe suport reprezentat de folii de acetat de celuloza sau lamele microscopice;
- practicarea in gel a unor godeuri cu diametrul de 3 mm;
- depunerea in godeuri a endospermului de orz (jumătate de bob fără embrion) și a extractului de testat (mediu de cultură a microorganismului);
- incubarea 72 h la temperatura camerei in incinta umeda;
- colorarea cu soluție de dezvoltare a gelului;
- măsurarea zonei de difuzie.

Fitohormonii giberelinici au fost extrași dintr-un mediu de cultură specific (LB) în care s-a incubat peste noapte o suspensie de 10⁶ufc/ml bacterii. Extractia s-a realizat prin dializă inversa a amestecului incubat peste noapte. Suspensia bacteriană a fost trecută intr-un sac de dializă, care a fost suspendat timp de 24 ore în acetat de etil (dializă inversă). Biotestul s-a lucrat față de martori de reactivi, rezultat din extractia, prin dializă inversă, a mediului LB. Tulpina Usa2 a produs în condițiile date peste 25 μg echivalenți acid giberelic per ml, la peste 2/3 din nivelul produs de o tulpină etalon de *Azospirillum brasiliense* Sp001, recunoscută pentru capacitatea ridicată de producere de fitohormoni giberelici.

Printr-o altă serie de experimente s-a urmărit biotestarea efectului stimulator a tulpinii Usa2 împreună cu alte tulpini etalon asupra creșterii unor plantule de floarea-soarelui și a avut in total 12 variante in 4 repetiții fiecare. Fiecare repetiție a avut 5 plante, iar fiecare varianta a avut 20 de plante. Tulpinile bacteriene au fost cultivate pe mediu LB lichid la 28°C, aerat și agitat prin amestecare la 150 rpm timp



de 16 ore. Semințele de floarea-soarelui (cv. Favorit) au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfecție a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 de secunde cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apa distilată sterilă. Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4 %, timp de 15 minute. Ulterior au fost realizate clătiri cu apa distilată, din 25 în 25 de minute timp de două ore. Semințele au fost inoculate prin imersie în 3 ml suspensie bacteriană în concentrație de 10^7 ufc/ml în tampon fosfat și 2 % carboxi-metil-celuloză, apoi au fost semăntate în pungi sterile de creștere "Cyg" (Mega International). Plantele au fost crescute în condiții controlate (temperatură de $22^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, iluminare 12 ore pe zi cu $250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$). După semănat și pe toată durata experimentului, pungile au fost umectate cu soluție nutritivă Hoagland 0,25%. Creșterea rădăcinuțelor plantelor de floarea-soarelui a fost analizată la 15 zile de la semănat (tab. 6).

Tab. 6 Lungimea totală (mm) a rădăcinilor plantelor de floarea soarelui (cv. favorit) la 15 zile de la semănat.

Varianta	Lungimea totală a rădăcinii (mm)	
Martor neinoculat	184.29	b
WCS 365	219.05	a
B 49 b	187.5	b
FL 400	174.54	b
Ps 33	173.5	b
56. 1s	184.75	b
Hm s1	200.86	ab
Cn s2	214.38	a
Sp s2	181.93	b
Tm s2	187	b
Usa2	225.79	a
77.3	292.6	b
Cp b5	199.28	ab

Tulpina Usa2 a prezentat cea mai mare capacitate de a stimula dezvoltarea plantulelor de floarea-soarelui, asigurată statistic față de martorul neinoculat.

A fost testată și capacitatea tulpinii Usa₂ pentru producerea de enzime cu rol în mineralizarea materialului vegetal, determinându-se activitatea celulazică, cea proteazică și cea amilazică.

Activitatea celulazică a fost determinată prin însămânțarea pe mediu minimal, fără sursă de carbon, repartizat în plăci petri, în care s-a adăugat 1% carboxi-metil-celuloză. Acestea au fost incubate la 28°C timp de 5 zile după care au fost colorate timp de 30 minute cu 0,3% roșu de Congo, urmata de clătire cu apă de robinet și fixarea colorantului prin incubare timp de 15 minute cu 10% acid acetic. Descompunerea substratului carboxi-metil-celuloză și, deci, producerea de

celulază a fost indicată de apariția unei zone clare în jurul creșterii bacteriene. Tulpina Usa2 produce celulază.

Producerea de amilază s-a pus în evidență prin însămânțarea sub formă de striu pe nutrient agar (NA) suplimentat cu 0,4% amidon solubil. Plăcile au fost incubate la 28°C timp de 48-72 ore, apoi inundate cu soluție de iod în iodură de potasiu. Zonele clare din jurul creșterii bacteriene, după adăugarea soluției de iod au indicat descompunerea amidonului din mediu deci, producerea de amilază. Testele au indicat faptul că tulpina Usa2 produce amilază.

Producerea de proteaze s-a testat pe mediu minimal mineral, suplimentat cu cazeină 5%. S-au inoculat tulpinile de bacterii de test și plăcile au fost incubate la 28°C timp de 48-72 ore. După incubare s-a tratat plăcile de agar au fost fixate cu o soluție de 50% metanol, 10% acid acetic glacial, 40% apă distilată, iar halo-urile din jurul coloniilor bacteriene au fost colorate cu o soluție de 60 mg/l Coomassie Blue R-250 în acid acetic 10%. Rezultatele au stabilit faptul că tulpina Usa2 este producătoare de proteaze.

Pentru că rezultatele au evidențiat faptul că tulpina Usa2 de *B. subtilis* produce enzime implicate în degradarea materialului vegetal, a fost testată și pentru capacitatea de mineralizare a substratului organic (prin determinarea respirației, folosind ca substrat material vegetal și a eliberării de glucide și fosfor solubile din materialul vegetal).

Pentru evidențierea capacității de degradare a materialului vegetal, s-a realizat un experiment prin care s-a urmărit consumul de oxigen și eliberarea diferiților compuși din material vegetal tratat cu tulpini de microorganisme. Materialul vegetal (fân de măzăriche păroasă în cazul bacteriilor sporulate gram pozitive) a fost măcinat în blender și trecut apoi pe sita de 0,250 mm. S-au ambalat câte 10 g de pulbere în pungi de polietilena, care s-au sterilizat prin iradiere gamma (la IRASM, IFIN, București). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g care s-au adus aseptice într-un Erlenmayer de 50 ml steril. Peste pulberea fin măcinată, s-au adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. Conținutul a fost omogenizat prin agitare și inoculat apoi cu 1 ml suspensie microbiană, normalizată la 10^8 ufc/ml. S-a menținut la agitator timp de 24 ore, 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 respirație / producere de bioxid de carbon timp de 12 ore. După efectuarea determinărilor de respirație, s-a separat prin filtrare supernatantul, în care s-a determinat Carbonul Organic Total (TOC) cu un aparat Formacs HT (Skalar Analytical B.V., Breda Olanda), glucidele reducătoare (cu reactiv DNS) și fosforul solubil total (cu molibdat de amoniu și reactiv clorostanic).



Pentru determinarea capacității de mineralizare a substratului vegetal au fost testate 7 tulpini bacteriene: 56.1s; 77.3; 58.2, 77.1s și 82.1s din probe de sol provenite din Bărăganul de sud; Usa2 izolat din rizosferă de usturoi (Oltenia de Sud) și Mz.s1 izolat din sol cultivat cu mazăre (Dobrogea de sud) și 3 tulpini de *Trichoderma*: Td67 și Td85 izolate din Bărăganul de Sud și Tm, izolat din Oltenia de Sud. Probele au fost analizate comparativ cu doi martori respectiv, martor fără inocul bacterian și martor în care bacteria a fost cultivată în mediu uzual de creștere (Luria Bertani lichid).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 7. Aceste rezultate demonstrează existența unei activități ridicate de hidroliză a materialului vegetal de către majoritatea tulpinilor de microorganisme testate (care anterior, în testele de screening au prezentat activitate celulazică, proteazică, amilazică).

Tab. 7. Activitatea de degradare a materialului vegetal de către tulpinile de microorganisme testate*.

Tulpina	Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară)	Conținut de carbon organic total în supernatant (mcg/l)	Glucide solubile (mcg/l)	Fosfor solubil (mcg/l)
56.1s	0,12±0,03c	0,24±0,02c	1,67±0,06c	0,02±0,01c
77.3	1,56±0,32b	3,87± 1,17b	12,24±0,28b	17,87± 2,17b
58.2	1,51±0,05b	4,54±1,05b	12,64±0,41b	16,54±1,25b
77.1s	1,54±0,24b	4,54±1,25b	12,64±0,41b	18,42±1,54b
82.1s	1,85±0,18ab	5,87± 3,17ab	22,24±0,28ab	27,87± 4,17ab
Usa ₂	2,15±0,04a	7,24±2,52a	29,87±0,36a	35,24±3,52a
Mz.s1	1,62±0,12b	3,24±1,12b	11,87±0,63b	15,24±2,27b
Td67	1,58±0,28b	3,87± 1,72b	12,24±0,28	17,87± 3,23b
Td85	2,24±0,14a	7,54±1,25a	27,64±0,81a	36,44±4,07a
Tm	1,87±0,16ab	5,24±2,85ab	16,72±0,74b	15,42±2,23b

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05.

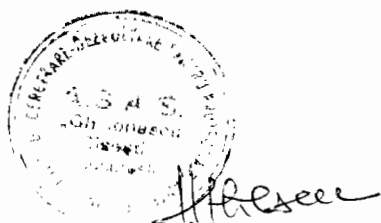
Martorul negativ conferă informații în timp real, referitoare la comportamentul unor probe ideale, fără activitate biologică de degradare a substratului vegetal, în condițiile de desfășurare a testului. În această variantă, substratul vegetal nu a fost inoculat cu microorganisme și a fost menținut în condiții identice de incubare cu cele ale probelor test. Acesta oferă informații referitoare la cantitatea maximă de oxigen care ar putea fi regăsită în probe fără activitate de biodegradare. Martorul pozitiv oferă informații cu privire la capacitatea

de dezvoltare a tulpinii analizate, în condițiile unei cultivări pe mediu uzual de creștere. Acest mediu permite multiplicarea microorganismului datorita unei hrăni corespunzătoare și în condițiile de incubare oferite pe parcursul desfășurării testului.

Tulpina Usa2 prezintă o foarte ridicată capacitate de degradare a materialului vegetal, la nivelul ciupercilor din genul *Trichoderma*, ciuperci larg utilizate pentru accelerarea dezvoltării materialului vegetal.

A fost testată și capacitatea de producere de poliamine de către bacteriile selecționate. Mecanismul de acțiune prin care mulciul vegetal de leguminoase, și în special de mazărice păroasă își exercită acțiunea de stimulare a creșterii plantelor este cel de modulare a nivelului de poliamine din plante (compuși cu acțiune de reglare a proceselor metabolice din plante recunoscuți în ultimul deceniu). Modularea se realizează prin aportul de poliamine endogene și precursori, compuși formați datorită descompunerii materialului vegetal de leguminoase, cu un conținut ridicat de proteine. Bacteriile gram pozitive sporulate care sunt cele mai potrivite pentru formarea mulciului bioactiv sunt deci acele microorganisme care au capacitatea cea mai ridicată de a produce poliamine din materialul vegetal de mazărice păroasă. S-a lucrat cu pulbere de mazărice păroasă, obținută conform metodei descrise deja. Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g de pulbere de material vegetal, care s-au adus aseptice într-un Erlenmayer de 50 ml, steril. Peste pulberea fin măcinată s-au adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. S-a omogenizat prin agitare și s-a inoculat apoi cu 1 ml suspensie bacteriană, provenită din cultură de 12 ore pe mediu LB, normalizată la 10^8 ufc/ml. S-a menținut la agitator timp de 72 ore, la temperatura de 28°C, după care s-a separat cultura bacteriană prin centrifugare la 5000xg pentru 20 min la 4°C. Supernatantul a fost acidificat cu acid percloric, până la obținerea unei soluții de concentrație finală 5%. Supernatantul acidificat a fost derivatizat prin dansilare (Smith și Meeuse, 1996, Garcia-Moruno *et al.*, 2005, Cassan *et al.*, 2009). Poliaminele au fost sperate și identificate prin cromatografie în strat subțire, folosind amestecuri cloroform-trietanolamină (9:1) și n-hexan- acetat de etil (2:1) și comparându-le cu valorile compușilor standard dansilați. Plăcile de siliciu au fost observate în lumină UV, spoturile selectate au fost trecute cantitativ de pe placă într-o eprubetă. Din silicagel s-au eluat poliaminele dansilate cu soluție de metanol-toluen (9:1). Fluorescența a fost măsurată prin spectrofluorimetrie, folosind lumină de excitare de 415 nm și lumină de emisie de 510 nm.

Rezultatele au demonstrat faptul că tulpina Usa₂ are cea mai mare capacitate de producere de poliamine (compuși implicați mai ales în răspunsul plantelor la diferite forme de stres) din materialul vegetal de mazărice păroasă.



Capacitatea sa este mai ridicată decât a tulpinii etalon Az39 de *Azospirillum brasiliense*, citată în literatura de specialitate ca fiind producătoare de poliamine. (Cassana et al., 2009, Cadaverine production by *Azospirillum brasiliense* and its role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. Eur J. Soil Biology 45: 12-19).

Tulpina Usa2 a fost analizată în ceea ce privește inocuitatea pe larve de *Galleria mellonella* în conformitate cu protocolul descris de Seed et al. în 2008. Pentru aceasta, tulpina Usa2 de *Bacillus subtilis* a fost cultivată pe mediul LB la 28°C cu agitare la 150 rpm timp de 48 ore, după care a fost centrifugată la 4000 rpm, iar sedimentul a fost resuspendat în 10mM MgSO₄ suplimentat cu 1,2 mg/ml ampicilina. Concentrația inoculului utilizat pentru tratarea larvelor a fost măsurată cu spectrofotometrul la OD 600 (cunoscându-se ca OD600 = 1 reprezintă 10⁸ ufc/ml). Larvele de *G. mellonella* au fost crescute pe mediul Haydak la 30°C. Pentru testul de inocuitate, larvele în ultimul stadiu au fost ținute la 4°C timp de 5 minute, după care au fost injectate cu 5μl suspensie bacteriană, utilizând o seringă Hamilton. Fiecare variantă de diluție a cuprins 30 larve, iar zece larve au fost utilizate pentru fiecare repetiție. Varianta martor a constatat în larve injectate cu 5μl 10mM MgSO₄ și 1,2 mg/ml ampicilin în scopul analizării efectelor fizice letale determinate de injecții. Larvele inoculate au fost menținute apoi pe mediul Haydak la 30°C în întuneric. La 24, 48 și 72 ore după infecție larvele au fost analizate, iar cele moarte au fost numărate. Larvele care nu au prezentat semne vitale la atingerea cu vârful pipetei au fost considerate moarte. Rezultatele au evidențiat faptul că tulpina Usa2, nici atunci când a fost aplicată nediluată, nu a determinat o mortalitate mai mare de 50%, iar la diluția de 10³ ufc/mL⁻¹ nu s-a determinat mortalitatea larvelor de *G. mellonella* (tabel 8).

Tab. 8. Mortalitate larvelor de *Galleria mellonella* injectate cu suspensii bacteriene de 10⁶ ufc/ml din tulpinile de testat.

Varianta	Repetiția	24 ore post-infecție		48 ore post-infecție		72 ore post-infecție		
		vii	moarte	vii	moarte	vii	moarte	crisalide
Martor 10 mM MgSO ₄ + 1.2 mg/ml ampicilina (DO 0,000)	R1	10	0	10	0	10	0	2
	R2	10	0	10	0	9	1	1
	R3	10	0	10	0	9	1	-
Usa ₂ 10 ⁶ ufc/ml	R1	10	0	9	1	8	2	-
	R2	8	2	8	2	8	2	-
	R3	10	0	10	0	9	1	1

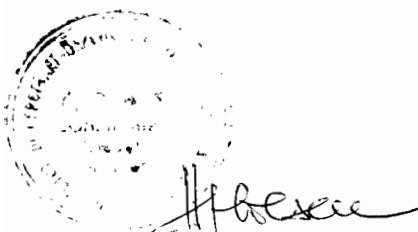
Datele din tab. 8 demonstrează faptul că tulpina testată, Usa2, nu prezintă practic patogenitate față de larvele de *Galleria mellonella*, neavând capacitatea de a se multiplica în corpul larvelor și de a produce bacteremii, deși au fost injectate în limfa larvelor. Seriile de experimente întreprinse în scopul verificării activității biologice a tulpinii Usa2 de *Bacillus subtilis* au demonstrat prezența unui spectru larg de acțiune antifungică față de diferite ciuperci fitopatogene, o capacitate semnificativă de stimulare a creșterii plantelor și o activitate mărită de producere a unor exohidrolaze implicate în mineralizarea materialului vegetal. Tulpina Usa2 nu prezintă patogenitate pentru organisme ne-țintă.

Toate aceste caracteristici prezintă complementaritate cu tehnologiile agricole conservative, inclusiv cu cele care implică conversia culturilor verzi de protecție în timpul iernii în mulci. În aceste tipuri de tehnologii conservative, 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 tulpinilor cu calități biologice menționate anterior peste resturile vegetale de pe sol, compensează aceste dezavantaje ale tehnologiilor agricole conservative.

Pentru a verifica în practică modul în care caracteristicile favorabile ale tulpinii Usa2 compensează o serie din dezavantajele sistemelor de agricultură conservativă s-a realizat un experiment de câmp.

Experimentele de cultivare au fost realizate pe un cernoziom cambic, la Amzacea (Dobrogea). Cultura de mazăriche de toamnă (păroasă) *Vicia villosa*, cv. Welta, a fost semănată direct în miriștea de grâu, la sfârșitul lunii septembrie. S-a folosit o mașină de semănat direct în miriște și s-a semănat la o densitate de 120 ...140 boabe germinabile de mazăriche/m², corespunzând unei cantități de 40...45 kg/ha. Adâncimea de semănat a fost de 5...6 cm.

În primăvară s-a transformat cultura de mazăriche în mulci bioactiv prin tăvălugire, și tratare cu 900 ... 1000 litri de suspensie care include un erbicid total pe bază de glifosat, aplicat în doză de 1,25 ... 1,5 kg s.a./ha și o suspensie de 10⁵ ufc/ml *Bacillus subtilis* Usa2. La 5 zile după tratamentul cu bacterii s-a însămânțat o cultură de floarea-soarelui (cv. Rumbasol Or), la o densitate de 50 ... 55000 semințe germinabile/ha, direct în mulciul vegetal, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște. În continuare cultura de floarea-soarelui s-a întreținut conform tehnologiei uzuale până la recoltare. S-a lucrat față de o variantă martor intensiv, la care s-a realizat arătură de toamnă adâncă, tratarea cu erbicide pre-mergente și post-mergente. De asemenea s-a folosit și o variantă la care nu s-a realizat bioactivarea mulciului vegetal cu bacterii Usa2. Fiecare variantă a fost realizată în 4 repetiții.



În stadiul apariției primelor calatidii înflorite în cadrul dezvoltării florii soarelui s-a determinat vigoarea plantelor, înălțimea și biomasa aeriană. Vigoarea plantelor s-a diferențiat semnificativ în stadiul apariției primelor calatidii. Pe o scară de la 1 la 9, la sistemul intensiv vigoarea plantelor a fost de doar 7, în pofida condițiilor climatice foarte favorabile pentru floarea-soarelui în anul de experimentare. La sistemul în care s-a folosit mulci vegetal vigoarea a crescut la 7,5. La sistemul cu mulci bioactivat, tratament al mulciului cu suspensie de bacterii Usa2 plantele de floarea-soarelui au prezentat o vigoare sporită de 8,5. Înălțimea plantelor nu a fost influențată semnificativ de sistemul tehnologic, dar la mulciul bioactiv(at) cu Usa2 plantele au acumulat o semnificativ mai multă biomasă. În final vigoarea suplimentară a plantelor de floarea-soarelui cultivate în mulci bioactivat s-a concretizat într-un spor de producție de aprox.10%. Rezultatele experimentului de câmp sunt prezentate în tab. 9.

Tab. 9. Influența diferitelor sisteme tehnologice asupra creșterii și producției florii-soarelui¹.

Amzacea, 2010

Varianta	Vigoarea ² medie a plantelor	Înălțimea plantei ² (cm)	Biomasă aeriană uscată ² (g)	Producția kg/ha
Martor intensiv, arat	7	96,6a	8,85a	2820a
Mulci vegetal	7,5	98,3a	9,08a	2920a
Mulci vegetal bioactivat cu Usa2	8,5	94,5a	9,87b	3270b

¹ - valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P > 0,05$.

² - stadiul apariției calatidiilor înflorite, vigoarea 1 - plante mici cu frunze mici; 9 - plante mari cu frunze robuste

Creșterile de producție s-au realizat în condițiile unui sistem conservativ, în care sunt reduse costurile de producție aferente folosirii erbicidelor și arăturii, iar folosirea unei culturi de protecție de mazărice în timpul iernii este încurajată prin plățile compensatorii asociate măsurilor de agro-mediu.



TULPINA DE *BACILLUS SUBTILIS* CU ACTIVITATE DE COMBATERE A
AGENȚILOR FITOPATOGENI DIN SOL, STIMULARE A CREȘTERII PLANTELOR ȘI
BIODEGRADARE CONTROLATĂ A MATERIALULUI VEGETAL

Revendicare

1. Tulpina *B. subtilis* Usa2, număr de depozit DSMZ 23654, caracterizată prin aceea că exercită acțiuni benefice asupra diferitelor plante de cultură, datorită activității de protecție față de ciupercile fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Pythium debaryanum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*, producerii *in situ* de factori de creștere pentru plante și capacității de degradare controlată a materialului vegetal cu formare de poliamine, compuși care cresc rezistența plantelor la stress-urile biotice și abiotice, care se concretizează prin sporuri de producție la floarea-soarelui, realizate în condițiile unui sistem agricol conservativ, în care sunt reduse costurile de producție aferente folosirii erbicidelor și arăturii.

