



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01381**

(22) Data de depozit: **21.12.2010**

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

(54) **TULPINĂ DEBACILLUS SUBTILIS ANTAGONISTĂ FAȚĂ DE
CIUPERCI FITOPATOGENE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Bacillus subtilis* B30, cu număr de depozit NCAIM (P) B001359 și număr GenBankEU334510, destinată utilizării ca bioinoculant pentru tratamentul semințelor și solului, rezultată prin selecția în trepte a unor izolate naturale din sol. Tulpina *B. subtilis* B30 prezintă un spectru larg de acțiune antifungică față de o serie de ciuperci fitopatogene și, totodată, stimulează creșterea plantelor

prin producere de auxine. Tulpina modelează, de asemenea, formarea de consorții microbiene de consens cu alte bacterii utilizate ca bioinoculanți, datorită activității lactonazice care influențează semnalele AHL implicate în realizarea sensibilității de grup.

Revendicări: 1



TULPINĂ DE *BACILLUS SUBTILIS* ANTAGONISTĂ FATĂ DE CIUPERCI FITOPATOGENE

Prezenta invenție se referă la tulpina de *Bacillus subtilis* B30, destinată utilizării ca bioinoculant pentru tratamentul seminței și/sau al solului, inclusiv sub forma unor biopreparate complexe.

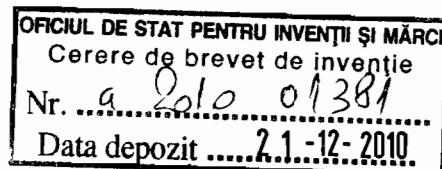
Sunt cunoscute mai multe tulpini de *Bacillus subtilis* care au activitate de combatere a agenților fitopatogeni. Brevetul WO 2007/043771 se referă la compoziții pentru prevenirea bolilor plantelor pe baza tulpinilor KCCM 10639 sau KCCM 10640 de *B. subtilis* și un procedeu de aplicare a acestor compoziții. 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 cassicola*, *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 modulare a sensibilității de grup, cu rol în realizarea consorțiilor și biopreparatelor multitulpinale.

Tulpina *B. subtilis* B30 prezintă următoarele avantaje:

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



- capacitate de a modula formarea consorțiilor microbiene de consens cu alte bacterii utilizate ca bioinoculanți datorită activității lactonazice prin care influențează semnalele AHL implicate în realizarea sensibilității de grup;
- spectru larg de acțiune împotriva atacului a numeroase ciuperci fitopatogene;
- stimularea creșterii plantelor datorită producerii *in situ* de fitohormoni.

Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos

Exemplu. Tulpina B30 de *Bacillus subtilis* a fost izolată la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, din probe de sol provenite din Bărăgan. Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 250 izolate de *Bacillus spp.*, pe baza acțiunii benefice exercitate asupra diferitelor plante de cultură (tomate, castraveți, floarea-soarelui), datorită acțiunii de protecție a plantelor față de următoarele ciuperci fitopatogene: *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola*, *Alternaria spp.*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride*), producerii de fitohormoni și activității lactonazice prin care influențează semnalele AHL implicate în sensibilitatea de grup.

În vederea încadrării taxonomice tulpina B30 a fost caracterizată din punct de vedere morfologic (tabel 1), biochimic (tabel 2) și pe baza secvenței 16S rADN.

Tab. 1. Morfologia coloniilor de *Bacillus subtilis* B30 pe diferite medii după cultivare timp de 24 ore.

Mediul utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii B30		
		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
	mediu cu extract de sol	crem-brun	rugoase, margini neregulate	colonii medii
Medii solide naturale	felii de cartof sterile	brun	rugoase, margini neregulate, centru cu rugozități fine	colonii mari
Medii lichide	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	-



H. H. H. H. H.

Tab. 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii de *B. subtilis* B30.

Testul biochimic	Tulpina B30
Reacția Gram	+
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Reducerea NO ₃ →NO ₂	+
Creștere anaeroba	-
Catalaza	+
Sursa de carbon:	
malonat	+
citrat	+
propionat	-
tartrat	+
trehaloza	+
glucoza	+
Acidifica:	
xiloza	+
glucoza	+
arabinoza	±
manitol	+
rafinoza	+
celobioza	+
Toleranta la NaCl 7%	+

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin amplificarea PCR utilizând primerii 27fm (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') și r1522 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') (Weisberg *et al.*, 1991). Producții de amplificare enzimatică au fost separați în gel agarizat 1%, iar fragmentul 16S rADN a fost extras din gel și purificat cu chitul QIAGEN (QIAGEN Benelux BV, Venlo, Olanda). Secvențierea a fost efectuată la ServiceXS (Leiden, Olanda), fiind urmată de procesarea cu programul Vector NTI 10 (Invitrogen, SUA). Pentru identificarea taxonomică pe baza secvențelor s-au realizat cercetări referitoare la similaritatea secvențelor în Genbank, utilizând softul NCBI Taxonomy BLAST. Secvențele rezultate au fost depuse la GenBank. Încadrarea taxonomică a tulpinii B30 s-a bazat pe o similaritate de cel puțin 98% între secvența 16S rADN a acestei tulpini cu cele ale altor tulpini a căror încadrare taxonomică este recunoscută. Secvențele 16S rADN pentru tulpina B30, depuse la GenBank, au numărul de acces EU334510.

Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii B30 a fost efectuată pe mediul cu cartof dextroza agar (CGA - PDA). Tulpina B30 (dintr-o cultura de 24 ore) a fost însămânțată pe mediu prin strierea cu ansa a unei linii drepte o distanță de 3 cm de o rondea calibrată de miceliu (5mm) din cele nouă ciuperci studiate. Plăcile Petri astfel însămânțate au fost incubate la 28°C și analizate în



Handwritten signature

ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 24, 48 și 72 ore. Experiența a fost repetată de trei ori.

Tab. 3. Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Bacillus subtilis* B30 asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 ore, mm).

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție indusă de tulpina B30 (mm)
<i>Rhizoctonia solani</i>	12
<i>Pythium ultimum</i>	9
<i>Pythium aphanidermatum</i>	6
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>graminearum</i>	5
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	6
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5
<i>Sclerotium bataticola</i>	4
<i>Trichoderma viride</i>	8
<i>Alternaria</i> spp.	6
<i>Botrytis cinerea</i>	8

Rezultatele au demonstrat că tulpina B30 produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciuperca *R. solani* (12 mm) aceasta fiind urmată de *P. ultimum* (9 mm) și *T. viride* (8 mm).

Tulpina B30 a fost testată în condiții de sera în ceea ce privește eficacitatea în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxisporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*), care apar frecvent în stadiul de plantulă/ răsăd și produc pagube datorită pierderilor de material săditor (care pot atinge până la 30% răsăduri) și care duc implicit la reducerea producției.

Operațiunile implicate au constat în pregătirea inoculului bacterian prin înmprospătarea în eprubete (incubate la 27°C timp de 2-3 zile) pe mediul cartof-glucoza-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 minute, prin inocularea cu miceliu și incubarea la 27°C timp de 3-4 zile.

Substratul utilizat în sera 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 ore înainte de semănat.

Materialul vegetal, respectiv semințele de floarea soarelui (Festiv), tomate (Unirea) și castravete (Cornichon) au fost tratate înainte de semănat prin imersie, timp de 20 minute, în suspensiile bacteriene al căror titru a fost stabilit la 10⁸ ufc/ml.



H. Hănescu

În primul experiment au fost testate împreună cu B30 alte 5 tulpini de *B. subtilis* și anume: Bs23, Bs27, Bs36, Bs45, Bs48. Inocul fungic aplicat a constat în complexul *R. solani* + *F. oxysporum* f. sp. *graminearum* + *P. de baryanum* (RFP), *S. sclerotiorum* și *S. bataticola*. Au fost utilizate semințe de floarea soarelui (Festiv) și castraveți (Cornichon).

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 castraveți a evidențiat următoarele:

La cultura de floarea-soarelui, lungimea rădăcinii a fost influențată de factorul A (inoculul fungic) independent de factorul B - inoculul bacterian (Tab. 4). 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.

Tab. 4. Lungimea rădăcinii (mm) plantelor de floarea-soarelui (cv. Festiv) sub influența tratamentelor biologice cu diferite izolate de *B. subtilis* la sămânță și cu inoculanți fungici aplicați în sol.

Factor A (inocul fungic)	Tiradin 70 PU (4g/kg)	Martor ne bact., inoculat	Bs23	Bs27	Bs30	Bs36	Bs45	Bs48	Medii factor A
R-F-P	59,05bcd	27,77i	68,68b	59,57bcd	94,82a	65,27bc	39,40ghi	55,87b-f	63,25a
Ss	49,03c-g	27,85i	40,31f-i	37,61ghi	60,83bc	30,96hi	59,76bcd	36,67ghi	45,78b
Sb	51,02c-g	27,33i	40,35f-i	32,44hi	41,79e-i	26,51i	56,78b-e	44,6d-h	41,19b
Medii factor B	53,04b	27,65e	49,781bc	43,208bc	65,817a	40,917cd	52,01b	45,70bc	

Valorile urmate de aceeași litera nu diferă semnificativ pentru $P < 0,05$ (DS A5%=5,306 DS B5%=10,202 DS AB5%= 15,919)

Studiul interacțiunii tratamentelor biologice asupra rădăcinilor plantelor de floarea-soarelui, au relevat următoarele: (i) în cazul utilizării complexului ciupercilor fitopatogene de sol R.F.P. tulpina B30 a determinat cele mai mari creșteri ale rădăcinilor plantelor (asigurate statistic față de martorul netratat) urmate de izolatele de *B. subtilis* Bs23 și Bs36; (ii) în variantele solului inoculat cu ciuperca *S. sclerotiorum*, cele mai mari creșteri vegetative ale rădăcinilor s-au notat la plantulele rezultate din semințele bacterizate cu tulpina de *B. subtilis* B30.



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*.

Tab. 5. 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 (4g/kg)	Martor ne bact. Inoculat	Bs23	Bs27	Bs30	Bs36	Bs45	Bs48	Medii factor A
R-F-P	136,11d-f	73,11lm	150,39cd	134,68def	186,53a	129,35efg	104,15ij	117,23g-j	133,57a
Ss	115,66g-j	65,23m	124,66fgh	123,36fgh	127,74efg	113,71g-j	133,86def	128,29efg	119,60b
Sb	127,23e-h	78,22lm	118,80f-j	100,24jk	144,51cde	105,88ij	121,38f-i	113,83g-j	118,43b
Medii factor B	126,34bc	72,19d	131,28b	119,42bc	152,92a	116,32c	119,80bc	119,78bc	

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

Izolatele de *B. subtilis*, independent de ciupercile de sol testate, au determinat cele mai mari creșteri ale lungimii totale a plantelor, pe solul infectat cu complexul R.F.P. și cel infectat cu ciuperca *S. bataticola*, asigurate statistic fata de martorul netratat, în varianta bacterizată cu *B. subtilis* B30. Acestea au avut valori distinct semnificative față de tulpinile Bs23, Bs27, Bs45, Bs48 și Bs36.

Interacțiunea celor două tipuri de inocul biologic a demonstrat faptul că tulpina B30 a favorizat distinct semnificativ creșterea totală a plantelor de floarea-soarelui comparativ cu martorul netratat și cu varianta tratată chimic.

Calculul eficacității tratamentelor cu *B. subtilis* la sămânța de floarea-soarelui (cv. Festiv), în prevenirea atacului ciupercilor de sol luate în studiu, a reflectat faptul că tulpina B30 a avut o eficacitate de combatere a complexului ciupercilor fitopatogene de sol R.F.P. superioară (77%) comparativ cu martorul etalon chimic (70%).

Lungimea totală a plantelor de castraveți (tab.6) a fost influențată de tratamentele biologice cu inoculanții fungici, valori distinct semnificative, asigurate statistic fata de martorul netratat, rezultând în varianta inoculată cu *S. bataticola*. Tratamentul cu tulpina de *B. subtilis* B30, independent de tratamentele cu patogenii fungici, a influențat pozitiv lungimea totală a plantelor, valorile rezultate în urma analizei varianței fiind distinct semnificative comparativ martorul netratat. Interacțiunea celor două tipuri de inoculanți, bacterian și fungic, a relevat faptul că tulpina B30 a determinat creșteri distinct semnificative ale lungimii totale a plantelor de castraveți față de martorul netratat și varianta tratată chimic.



În cadrul unei alte serii de experimente semințele de castraveți (varietatea Cornishon) au fost inoculate prin imersie cu următoarele tulpini de *Bacillus subtilis*: Bs 1.98a; Bs sal; Bs lob1; Bs 98 și B30 urmărindu-se analiza capacității de protecție a culturii de castraveți față de infecția cu 5 ciuperci fitopatogene telurice: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium bataticola*, *Pythium de baryanum*, *Rhizoctonia solani* și *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tabel 9. Eficacitatea tulpinilor de *B. subtilis* în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol la cultura de castraveți (Cornichon) în condiții de seră (21–24°C și 70% umiditate relativă).

Inocul fungic→	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Sclerotium bataticola</i>		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		<i>Pythium ultimum</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>	
	% plante sănătoase izolat	Eficacitatea (%) -se răsărite	% plante sănătoase izolat	Eficacitatea (%) -se răsărite	% plante sănătoase izolat	Eficacitatea (%) -se răsărite	% plante sănătoase izolat	Eficacitatea (%) -se răsărite	% plante sănătoase izolat	Eficacitatea (%) -se răsărite
Bs 1.98a	70	50	70	40	90	82	70	50	45	15
Bs sal	76	60	80	60	93	87	77	62	63	43
Bs lob1	87	78	83	66	98	96	90	88	87	80
Bs 98	70	50	70	40	90	82	65	42	83	74
Bs 30	93	88	90	80	100	100	100	100	93	89
Tiradin 70 PU (4g/kg)	77	65	90	80	87	76	93	88	77	65
Mt. netratat	40	-	50	-	45	-	40	-	35	-

Calculul eficacității tratamentelor cu *B. subtilis* aplicate la semințele de castraveți a condus la următoarele observații (tab. 9):

- În variantele tratate cu *B. subtilis* B30 s-au înregistrat cele mai mari valori ale eficacității pentru toate cele 5 ciuperci studiate, iar în cele în care solul a fost infectat cu *S. sclerotiorum* și *P. ultimum*, eficacitatea a fost de 100%, valoare absentă în varianta matorului etalon chimic (care a înregistrat valori de 76 și respectiv 88%).
- În variantele infectate cu *F. oxysporum*, cea mai mare eficacitate s-a obținut în urma utilizării tulpinii de *B. subtilis* B30 (88%) urmată de *B. subtilis* Bs lob 1 (78%).
- Pe solul infectat cu *S. bataticola*, varianta inoculată cu *B. subtilis* B30 a avut cea mai mare eficacitate (80%). Cea mai slabă eficacitate s-a înregistrat în variantele tratate cu tulpinile Bs 1.98a și Bs 98 (au avut o eficacitate egală de 40%).



H. H. H. H.

- Pe solul infectat cu *P. ultimum*, eficacitatea maximă s-a înregistrat în varianta tratată cu tulpina de *B. subtilis* B30 (100%), aceasta fiind urmată de varianta tratată cu *B. subtilis* Bs lob 1 (88%).
- Eficacitatea tratamentelor biologice pe solul infectat cu *R. solani*, a evidențiat varianta tulpinii *B. subtilis* B30 (89%), urmată de tulpinile de *B. subtilis* Bs lob1 și Bs 98. Cea mai mică eficacitate a avut-o varianta în care semințele s-au tratat cu *B. subtilis* Bs 1.98 (15%).
- Pe solul infectat cu *S. sclerotiorum*, cea mai mare eficacitate s-a obținut în varianta tratată cu *B. subtilis* B30(100%), urmată de varianta *B. subtilis* Bs lob1 (96%).

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

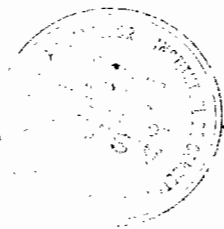
Baloane Erlenmayer (250 ml) cu 25 ml mediu Landy au fost inoculate cu tulpina B30 și incubate la 28°C, cu agitare la 150 rpm timp de 72 ore. Supernatantul a fost amestecat în proporție de 1:1 cu solventul și incubat la 28°C și agitat la 150 rpm/min timp de 8 ore, după care a urmat extracția propriu-zisă prin centrifugare la 4000 rpm/min și 4°C timp de 20 minute.

Faza organica a fost colectata și concentrata pe un evaporator rotativ în vid până la uscare.

În vederea separării și identificării fracțiunilor active din extractul brut, plăci cromatografice din aluminiu cu silicagel (HPTLC 20x20 cm silica gel60 F_{254s}, Merck) au fost revelate în sistemul de solvenți cloroform - metanol - apă (65:25:4 v/v/v). Din extractul brut au fost aplicați 10 μl per spot, iar frontul de migrare s-a limitat la 7 cm. Plăcile au fost vizualizate în lumina UV la 254 nm și s-au notat factorii de retenție.

Pentru identificarea spoturilor active față de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) și *Rhizoctonia solani* (Rs), s-a făcut testul bioautografic, care a constat în acoperirea cu 1% mediu cu cartof dextroza agar (PDA), inoculat cu spori de ciupercile în concentrație de 2x10⁶ spori/ml. Plăcile cromatografice au fost incubate la 28°C timp de 72-96 ore după care s-au vizualizat.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 10. Rezultatele au arătat că B30 produce 2 metaboliți antifungici și anume Bacilysin și Iturin A, fapt confirmat de zonele clare prezente pe plăcile auto(bio)grafice



H. Heseu

Tabel 10. Valorile Rf ale extractului brut provenit din tulpina B30 în sistemul cloroform - metanol - apa (65:25:4 v/v/v) vizualizate la 254 nm și pe plăcile auto(bio)grafice.

Tulpina	Valori Rf în sistemul cloroform - metanol - apa (65:25:4 v/v/v) vizualizat la 254 nm	Antibiotic antifungic (Loeffler, 1986)	Valorile Rf ale spoturilor active față de :	
			Forl	Rs
B30	0,09	Bacilizină	++	++
	0,20	-	-	-
	0,35	Iturină A	+++	++++
	0,40	-		

Legenda: zona de inhibiție ++ > 5 mm; +++ > 7 mm; ++++ > 10 mm; Rf= factor de retenție

Tulpina B30 a fost caracterizată în ceea ce privește producerea unor compuși care pot contribui la activitatea de protecție biologică a acesteia. Chitinaza și proteaza au un rol în antagonism prin degradarea peretelui celulelor fungice, celuloza este importanta pentru colonizarea rădăcinilor plantelor, iar lactonaza acționează asupra fitopatogenilor gram-negativi care utilizează acil-homoserin-lactona (AHL) ca semnal implicat în sensibilitatea de grup (*quorum sensing*).

Testul pentru producerea de proteaze a fost efectuat pe mediul Bazal (BM; Meyer and Abdallah, 1978) agarizat completat cu lapte smântânit 5%. Tulpina B30 a fost inoculată prin înțeparea mediului, după care plăcile au fost incubate la 28°C. După 5 zile acestea au fost analizate pentru prezenta zonelor clare în jurul locului de inoculare, acestea indicând producerea de proteaze.

Activitatea celulazică o fost determinata prin descompunerea substratului carboxi-metil-celuloza. Tulpina B30 a fost însămânțată pe plăci cu mediu LC agarizat care în partea superioară s-au acoperit cu un strat de agar + 1% carboxi-metil-celuloza. După 5 zile de incubare la 28°C, plăcile au fost colorate pentru 30 minute cu 0,3% roșu de Congo. Ulterior acestea au fost clătite cu apă de robinet, iar colorantul a fost fixat prin incubare pentru 15 min cu 10% acid acetic. Prezența unei zone clare a indicat producerea de celulaze.

Producerea de chitinaze a fost analizată prin descompunerea substratului CM-chitin-RBV (Carboxi-metil-chitină cuplată cu Remazol Brilliant Violet, Loewe Biochemica GmbH, Germania). B30 a fost însămânțată pe plăci cu mediu BM agarizat, care în partea superioară s-au acoperit cu un strat de agar + 50% (v/v) CM-Chitin-RBV ca sursa de carbon. După 5 zile acestea au fost analizate pentru prezența zonelor clare în jurul locului de inoculare, acestea indicând producerea de chitinaze.

Producerea de lactonază de către B30 a fost analizată prin inocularea a 2 ml de LB suplimentat cu 5 μ M C6-hexanoil-homoserin-lactona (C6-HHL) și crescut peste noapte la 28 °C și agitare 150 rpm/min. A fost folosit un martor negativ reprezentat de un mediul neinoculat care a fost incubat în aceleași condiții pentru a verifica dacă se produce lactoliză. Plăci Petri cu mediul LB + 50 μ g/ml Km au fost însămânțate cu tulpina biosenzor Cv026 de *Chromobacterium violaceum* (transformată să nu producă N-acil homoserin lactona). Godeuri tăiate (5 mm \varnothing) în mediul inoculat în plaja cu Cv06 au fost umplute cu 100 μ l din cultura de B30. Plăcile au fost incubate peste noapte la 28°C și analizate pentru prezența/ absența halourilor violacee în jurul godeurilor inoculate cu bacteria. Absența culorii a indicat faptul că toată C6-HHL a fost degradată și deci producerea de lactonază.

Rezultatele au demonstrat că tulpina B30 produce protează, celuloză și lactonază, dar nu produce chitinază.

În alte experimente s-a realizat testarea mobilității tulpinii B30. Mobilitatea joacă un rol major în colonizarea rădăcinilor plantelor și este factorul direct implicat în mecanismul de combatere biologică prin competiție pentru nutrienți și spațiu. *Bacillus subtilis* B30 a fost 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, *P. putida* PCL1760.

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

Tulpina B30 a demonstrat că posedă ambele tipuri de mobilitate, acest rezultat confirmând și producerea de către această tulpină de protează și surfactin.

Prezența auxinei în supernatantul culturii tulpinii *B. subtilis* B30 a fost detectată printr-o metodă colorimetrică specifică pentru compușii indolici. Pe scurt, patru tulpini de *B. subtilis* au fost inoculate în mediul nutrient broth (NB: peptonă 5 g; extract drojdie 1,5 g, extract carne 1,5 g, NaCl 5 g) cu și fără triptofan (precursorul auxinei; 100 mg/ml) și incubate la 30°C și 150 rpm. După o zi, 4 și 8 zile de la incubare, 5 ml au fost centrifugați la 13.000 rpm timp de 10 minute. Doi mililitri din supernatant au fost transferați într-un tub nou, în care s-au adăugat 100 μ l 10 mM acid ortofosforic și 4 ml reactiv Salkowski (2% soluție FeCl₃ 0,5 M în 35% acid percloric). Absorbanța a fost citită la 530 nm, după menținerea tuburilor pentru 30 minute la temperatura camerei.



H. Heseu

TULPINĂ DE *BACILLUS SUBTILIS* ANTAGONISTĂ FAȚĂ DE CIUPERCI FITOPATOGENE

Revendicare

1. Tulpina de *Bacillus subtilis* B30, cu numărul de depozit NCAIM (P) B001359 caracterizată prin aceea că: este antagonistă față de ciupercile fitopatogene: *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola*, *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride*, datorită producerii de antibiotice lipopetidice, baciizină și iturină A, precum și de enzime hidrolitice: celulază și protează, are activitate de stimulare a creșterii plantelor de tomate, castraveți și floarea-soarelui datorită producerii de hormoni auxinici, modulează formarea consorțiilor microbiene de consens cu alte bacterii utilizate ca bioinoculanți datorită activității lactonazice prin care influențează semnalele AHL implicate în realizarea sensibilității de grup.



H. H. H. H. H.