



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00972**

(22) Data de depozit: **07/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/09/ 2017** BOPI nr. **9/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2014 BOPI nr. **6/2014**

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

(72) Inventatori:
• **SICUIA OANA,** *STR.VICINA NR.3, BL.33,
SC.3, AP.153, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;*

• **CONSTANTINESCU FLORICA,**
*STR.EMANOIL PORUMBARU NR.67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **DINU SORINA,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **OANCEA FLORIN,** *STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO*

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

(54) **TULPINĂ DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*
CU POTENȚIAL DE UTILIZARE CA AGROINOCULANT
ÎN SUBSTRATURILE CU RISC FITOSANITAR RIDICAT
ȘI AMELIORATOR AL TERENURILOR CONTAMINATE
CU HIDROCARBURI**



RO 129512 B1

1 Prezenta invenție se referă la o nouă tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens*, destinată
utilizării ca agroinoculant pentru tratamente la sol, sămânță sau mulci din resturi vegetale,
3 în vederea reducerii presiunii de infecție a plantelor cu ciuperci fitopatogene de sol, și utili-
zării ca ameliorator al terenurilor contaminate cu hidrocarburi.

5 Se cunosc mai multe tulpini de *Bacillus amyloliquefaciens* cu proprietăți antifungice,
destinate combaterii ciupercilor patogene ale plantelor de cultură. **US 6960342 B2** descrie
7 tulpina B190 de *B. amyloliquefaciens* cu activitate de protejare a plantelor de cultură față de
un spectru larg de fungi fitopatogeni. **US 7615366 B2** descrie tulpina KTG0202 de *B.*
9 *amyloliquefaciens* (număr de colecție KCTC 10564BP) cu spectru antifungic variat, cu bună
eficacitate în combaterea făinărilor la plante și care inhibă infecția cu TMV (Virusul
11 Mozaicului Tutunului). **US 2010/0143316 A1** prezintă tulpina Ba-BPDI de *B.*
amyloliquefaciens (număr de colecție DSM21836) producătoare de enzime litice și antibio-
13 tice, cu activitate de biodegradare și proprietăți antifungice. **US 2001/0274673 A1** se referă
la tulpina NRRL B-50350 de *B. amyloliquefaciens* producătoare de enzime litice, capabilă
15 să degradeze diferiți compuși oleaginoși (precum grăsimi, unsori, uleiuri de uz alimentar) și
cu activitate fungicidă și fungistatică.

17 În ceea ce privește degradarea compușilor petrolieri, nu au fost brevetate tulpini de
Bacillus amyloliquefaciens cu astfel de proprietăți, ci numai tulpini ale altor specii. Brevetul
19 **US 4415661** menționează tulpina ATCC20614 de *Geotrichum marinum* și metode de
cultivare a acesteia, pentru degradarea compușilor petrolieri.

21 Nu s-au descris însă până acum tulpini de *B. amyloliquefaciens* care să prezinte con-
comitent un spectru larg de acțiune antifungică, care să reducă presiunea de infecție la
23 plante prin producerea de enzime litice, inhibitori ai formelor de sporulare a ciupercilor pato-
gene, cu capacitate de colonizare și bioconversie a substraturilor vegetale greu minerali-
25 zabile și activitate de diminuare a contaminării cu hidrocarburi petroliere.

Tulpina de *Bacillus amyloliquefaciens* OS 17, conform invenției, cu număr de acces
27 NCAIM (P) B 001415, este antagonistă față de ciupercile fitopatogene de sol care produc
ofilirea și căderea plantelor în primele stadii de vegetație sau infestarea produselor horticole
29 înainte de recoltare: *Alternaria sp.*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*,
Fusarium oxysporum f.sp. cepae, *Fusarium oxysporum f. sp. radices-lycopersici*, *Rhizoctonia*
31 *solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*, datorită
producerii de enzime hidrolitice, capabile să degradeze pereții celulari fungici, a sintezei de
33 compuși cu activitate antifungică și de biosurfactanți cu activitate de emulsionare a
hidrocarburilor petroliere.

35 Tulpina *Bacillus amyloliquefaciens* OS 17 prezintă următoarele avantaje:
- creștere bogată pe medii nutritive uzuale, utilizate pentru creșterea bacteriilor gram
37 pozitive sporulate;
- formare de spori cu viabilitate îndelungată și rezistență la condiții de stres termic;
39 - spectru larg de acțiune împotriva atacului ciupercilor fitopatogene de sol;
- capacitate de bioconversie a resturilor vegetale, cu formare de compuși biologic
41 activi, capabili să reducă riscul de contaminare cu fungi fitopatogeni prin inhibarea creșterilor
miceliene și a germinării sporilor fungici;
43 - capacitate de emulsionare a hidrocarburilor petroliere datorită producerii de
biosurfactanți.

45 Tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* (număr de depozit NCAIM (P) B
001415), conform invenției, a fost obținută prin selecție controlată, fără utilizarea de agenți
47 mutageni, fiind izolată din microbiota prezentă în mod natural în rizosfera de ceapă (*Allium*
cepa L.).

Exemplul 1

Tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, din rizosferă de ceapă (*Allium cepa* L.). Această tulpină a fost selectată pe baza acțiunii benefice exercitate asupra diferitelor plante de cultură (tomate, castraveți, ceapă) datorită acțiunii de protecție față de ciupercile fitopatogene de sol (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani* și *Sclerotium cepivorum*) și a producerii de biosurfactanți cu activitate de emulsionare a hidrocarburilor petroliere.

În vederea încadrării taxonomice, tulpina OS 17 a fost caracterizată din punct de vedere morfologic (tabel 1), fiziologic (tabel 2), biochimic (prin tehnica Biolog GEN III) și molecular (prin ITS-PCR).

Tabelul 1

Morfologia coloniilor de Bacillus amyloliquefaciens OS 17 pe diferite medii nutritive, după 24 h de cultivare

Mediul de cultură utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii OS 17 de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Medii gelificate semisintetice	Mediu cu decoct de cartof (CGA)	Colonii neregulate, cu profil ușor bombat și margine ondulat-lobată, de dimensiune medie și culoare bej.
	Mediu cu extract de carne (NB)	Colonii neregulate, medii spre mari ca dimensiune, de culoare alb-crem, cu profil bombat și margine neregulată lobată.
	Mediu cu extract de drojdie (LB)	Colonii de dimensiune medie, relativ circulare, cu profil bombat și margine ondulată.
Medii lichide	Mediu cu extract de carne (NB)	Dezvoltare preferențială la suprafața mediului de cultură în zona de maximă aerare. Creștere în peliculă uniformă, de culoare alb-crem.
	Mediu cu extract de drojdie (LB)	Dezvoltare preferențială la suprafața mediului de cultură, în zona de maximă aerare. Creștere în peliculă uniformă, densă, rugoasă.
	Mediu cu peptonă și dextroză (VP)	Creștere abundentă. La suprafața mediului de cultură, în zona de maximă aerare, formează o peliculă de culoare bej, ce se extinde în biofilm pe pereții vasului de cultură, în timp, din peliculă se desprinde biomasă și se creează sediment.

Tabelul 2

Caracteristicile fiziologice ale tulpinii OS 17

Testul biochimic	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17
Reacția Gram	+/variabil
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Solubilizare fitat de sodiu	-
Hidroliza gelatinei	+
Hidroliza argininei	-
Reducerea NO ₃ → NO ₂	+
Creștere anaerobă	-
Motilitate de migrare	+
Motilitate de agregare	+

Tabelul 2 (continuare)

Testul biochimic	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17
Producere de biofilm	+
Producere de siderofori	l
Catalază	+
Surse de carbon:	
Glucoză	+
Fructoză	+
Manoză	+
Sucroză	+
Celobioză	+
Malonat	-
Citrăt	-
Toleranța la NaCl 7%	+

Pentru încadrarea taxonomică prin tehnica ITS-PCR, au fost utilizați primerii universali f-ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') și r-ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'), (Biosearch, Technologies Inc.). Analiza a fost realizată comparativ cu alte tulpini de referință din genul *Bacillus*, prin examinarea profilelor electroforetice ale produșilor de amplificare în gel de agaroză 0,8%.

Identificarea cu ajutorul sistemului BIOLOG a fost realizată prin analiza profilului fenotipic al tulpinii OS 17, utilizând tehnica GEN III, protocolul B și softul Microlog 3 (5.2).

Identificarea cu ajutorul sistemului BIOLOG a fost realizată prin analiza profilului fenotipic al tulpinii OS 17 prin parcurgerea următoarelor etape: cultivarea timp de 18 h la temperatura standard de 33°C pe mediu special BUG (Biolog Universal Growth, Biolog Inc.); obținerea de colonii izolate prin tehnica de însămânțare prin epuizarea ansei; prepararea suspensiei bacteriene în fluid de inoculare de tip B, până la atingerea transmitanței de 97% la 590 nm; inocularea acesteia în microplăci de tip Biolog GEN III, câte 100 μl/godeu; incubarea la 33°C pentru 22 h; determinarea profilului fenotipic al tulpinii prin citirea densității optice la 590 nm și 750 nm cu ajutorul spectrofotometrului Biolog MicroStation Reader, analiza prin intermediul softului Microlog 3 (5.2) și stabilirea automată a apartenenței taxonomice prin analiza comparativă cu baza de date Biolog GEN III.

Coroborând datele obținute prin analiza polifazică, tulpina OS 17 a fost încadrată ca aparținând speciei *Bacillus amyloliquefaciens*.

Această tulpină a fost selectată datorită acțiunii antagoniste față de ciupercile fitopatogene *Alternaria sp.*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum f.sp. cepae*, *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*; proprietăților de diminuare a sporulării și întârziere a germinării conidiilor de *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici*; producerii de enzime litice precum celuloaze, chitinaze și proteaze, implicate în degradarea pereților fugici; mobilității de migrare/swimming și agregare/ swarming; formării de biofilm *in vitro*; capacității de colonizare a resturilor vegetale lignocelulozice și activității de protecție a plantulelor de tomate, respectiv, ceapă, față de infecțiile cu *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, respectiv *Sclerotium cepivorum*. De asemenea, această tulpină a fost selectată întrucât prezintă și activitate de emulsionare a hidrocarburilor petroliere datorită producerii de biosurfactanți.

Exemplul 2

Activitatea antagonistă a tulpinii OS 17 a fost pusă în evidență față de numeroase ciuperci fitopatogene de sol care produc ofilirea și căderea plantelor în primele stadii de vegetație sau care produc infestări ale produselor horticole înainte de recoltare, precum *Alternaria sp.*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum f.sp. cepae*, *Fusarium oxysporum f.sp. radidis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*).

Testarea *in vitro* a calităților antifungice ale tulpinii OS 17 a fost realizată prin metoda culturilor duble, pe mediu de cartof-glucoză-agar. În plăci Petri, cu diametrul de 9 cm, au fost plasate central rondelile miceliene calibrate cu preducea de 5 mm diametru. Biomasa bacteriană, provenită din cultură tânără, a fost inoculată prin striere, la 2 cm față de inoculul fungic. Testul a fost realizat în trei repetiții. Concomitent, au fost pregătite plăci martor, numai cu fung, pentru fiecare ciupercă. Plăcile astfel însămânțate au fost incubate la 26°C și analizate în primele 5 zile, în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) a creșterii miceliene. Ulterior, la 14 zile de la inoculare, activitatea antifungică a fost apreciată biometric prin evaluarea eficacității antagoniste a izolatelor bacteriene în inhibarea sau limitarea creșterilor fungice, după formula propusă de Lahlali și Hirji (2010). Confirmarea activității antagoniste față de fungii fitopatogeni testați se regăsește în tabelul 3.

Tabelul 3

Activitatea antagonistă a tulpinii OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* față de fungii fitopatogeni analizați

Ciuperca fitopatogenă	Zona clară de inhibiție (mm) indusă de OS 17 după 5 zile de incubare	Eficacitatea antagonistă (%) indusă de OS 17 după 14 zile de incubare
<i>Alternaria sp.</i>	7	69
<i>Botrytis allii</i>	11	71,1
<i>Botrytis cinerea</i>	-	74,1
<i>Fusarium graminearum</i>	4	66,7
<i>Fusarium oxysporum f.sp. cepae</i>	6	60
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radidis-lycopersici</i>	4	65,5
<i>Rhizoctonia solani</i>	4	69
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8,5	85,6
<i>Sclerotium bataticola</i>	6	63,5
<i>Sclerotium cepivorum</i>	4	64,4

Rezultatele au demonstrat că tulpina OS 17 produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea ciupercilor fitopatogene luate în studiu. Spectrul de acțiune fiind vast.

Exemplul 3

Tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost testată *in vitro* pentru determinarea capacității de inhibare a sporulării ciupercii *Fusarium oxysporum f.sp. radidis-lycopersici* ZUM 2407 ce produce putrezirea coletului și rădăcinilor de tomate. Inhibarea sporulării acestei ciuperci a fost posibilă prin utilizarea de supernatant bacterian din cultură de *Bacillus amyloliquefaciens* OS 17.

RO 129512 B1

1 Testul a fost realizat în baloane Erlenmayer de 50 ml, încărcate cu 10 ml mediu lichid
2 per probă, iar inițial a fost obținută cultura bacteriană, prin incubare 18 h la 28°C cu agitare
3 de 150 rpm. Cultura bacteriană a fost filtrată prin membrană sterilă de 0,22 μm pentru înde-
4 părțarea celulelor bacteriene, iar supernatantul a fost utilizat pentru testul de inhibare a
5 sporulării ciupercii. Simultan, au fost pregătite flacoane martor cu mediu de cultură nebacte-
6 rizat. Probele au fost apoi inoculate cu patogenul testat. În fiecare flacon au fost plasate câte
7 două rondele de miceliu fungic (6 mm diametru) cu creștere de aceeași vârstă. Capacitatea
8 de inhibare a sporulării ciupercii de către tulpina bacteriană OS 17 a fost analizată
9 comparativ cu un martor chimic reprezentat de TOPSIN 500SC (tiofanat metil 500 g/l), un
10 fungicid sistemic omologat pentru combaterea fitopatogenului analizat, pesticid utilizat în
11 concentrație finală de 0,14%, conform recomandărilor menționate de producător pentru com-
12 baterea acestui patogen. Ca martor, au fost utilizate culturi ale aceleiași ciuperci, obținute
13 în condiții similare, lipsite de tratament. Cuantificarea sporulării a fost făcută după 3,
14 respectiv, 5 zile de incubare la 28°C, sub agitare la 150 rpm, prin determinarea numărului
15 de spori prezenți în suspensie, utilizând camera Neubauer. Testul a fost realizat în 3 repetiții,
16 rezultatele fiind prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4

Inhibarea sporulării ciupercii *Fusarium oxysporum f.sp. radialis lycopersici* (FORL)

Varianta experimentală	Concentrația de spori (spori/ml)	
	după 3 zile	după 5 zile
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17	1,0 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵
Tratament chimic	1,1 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵
Martor netratat (FORL)	5,9 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁷

Exemplul 4

27 Determinarea capacității de întârziere a germinării sporilor de *Fusarium oxysporum*
28 *f.sp radialis-lycopersici* ZUM 2407 (FORL) manifestat de tulpina OS 17 de *Bacillus*
29 *amyloliquefaciens* a fost testată *in vitro* pe lame sterile de sticlă încărcate cu mediu CGA
30 dispus în strat uniform, subțire, câte 100 μl mediu/probă. Aceste suprafețe de mediu au fost
31 inoculate prin imersie, cu câte 10 μl suspensie conidii, în concentrație de 2 x 10⁶ spori de
32 FORL/ml. Cantitatea de spori în spoturile de mediu fiind de 2 x 10⁴ spori de FORL/probă.
33 Tratamentele bacteriene au constat în aplicarea a 20 μl supernatant bacterian filtrat inoculat
34 prin imersie pe suprafața mediului. Filtratul bacterian a fost obținut din culturi de 48 h obținute
35 în mediu lichid, centrifugate și filtrate prin membrană de 0,22 μm (MILLEX®GP) pentru
36 îndepărtarea celulelor bacteriene.

37 Lamele au fost incubate în plăci Petri sterile, la temperatura camerei, timp de 3 h.
38 Analizarea probelor a fost realizată la microscopul optic (MCI IOR), utilizând obiectivul de
39 40 X. Imaginile captate au fost preluate cu o cameră de luat vederi (Model GN-B100/SA/W5,
40 Gen Security) și folosite pentru analiza imaginii prin utilizarea programului APS Assess 2.0.
41 Acest soft a permis determinarea lungimii filamentelor miceliene dezvoltate prin germinarea
42 sporilor. Aprecierea tratamentelor bacteriene în ceea ce privește gradul de inhibare a
43 germinării sporilor de FORL a fost realizată prin analiza comparativă cu creșterile miceliene
44 dezvoltate pe lamele martor (fără tratament). Testul a fost repetat de trei ori.

45 Tratamentul cu supernatant bacterian filtrat provenit de la *B. amyloliquefaciens* OS
46 17 a condus la întârzierea germinării sporilor de FORL, cu o eficacitate de 82,8% în
47 diminuarea lungimii filamentelor miceliene, comparativ cu martorul fără tratament.

RO 129512 B1

Efectul inhibitor manifestat de tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* asupra sporulării ciupercii și germinării conidiilor de *Fusarium oxysporum f.sp. radialis-lycopersici* contribuie la creșterea eficacității de combatere a patogenului și la reducerea propagării infecțiilor. 1
3

Exemplul 5 5

Tulpina OS17 a fost testată *in vivo*, în condiții de seră și cameră de creștere, în vederea determinării eficacității de combatere a ciupercilor fitopatogene de sol: *Fusarium oxysporum f.sp. radialis-lycopersici*, respectiv, *Rhizoctonia solani* la tomate și *Sclerotium cepivorum* la ceapă. Aceste boli apar frecvent în stadiul de plantulă/răsad și produc pagube, fie datorită pierderilor de material săditor (răsaduri) și reducerii densității plantelor, fie datorită contaminării producției. 7
9
11

Operațiile implicate au constat în pregătirea inoculului bacterian prin cultivare în mediu lichid Luria Bertani (aerat prin agitare la 150 rpm și incubare la 28°C, timp de 2...3 zile), preluarea biomasei și realizarea suspensiilor bacteriene cu titrul de 10⁸ ufc/ml, în tampon fosfat. Pregătirea inoculului fungic fie prin cultivare în mediu lichid Czapek-Dox (timp de 5 zile cu incubare la 26°C și aerare prin agitare la 150 rpm) apoi preluarea suspensiei de conidii prin filtrare și titrarea la 10⁶ microconidii/ml pentru *Fusarium oxysporum f.sp. radialis-lycopersici*, fie prin cultivarea ciupercilor *Rhizoctonia solani*, respectiv *Sclerotium cepivorum* în plăci Roux, pe mediul din boabe de orz dezinfectate prin dublă autoclavare la 121°C timp de 30 min, apoi inocularea cu miceliu și incubarea la 25°C timp de 14 zile. Substratul de cultură utilizat a fost de tip universal, format din amestec de turbă *Sphagnum*, turbă neagră, humus de răme, argilă și nisip de râu, în proporții variabile (pH 6,5...7), dezinfectat înainte de utilizare, prin expunere la radiații ionizante gamma, în doză de 25 KGy. 13
15
17
19
21
23

În experimentul realizat în seră pentru prevenirea atacului de *Fusarium oxysporum f.sp. radialis-lycopersici* la tomate, infecția artificială a fost realizată la sol prin omogenizarea a 150 ml suspensie de spori în 20 kg substrat de cultură, înaintea distribuirii pământului în ghivece. Pentru experimentele realizate în vederea prevenirii atacului de *Rhizoctonia solani*, respectiv, *Sclerotium cepivorum*, în camera de creștere, inoculul fungic a fost omogenizat în substrat în proporție de 2%. 25
27
29

Materialul vegetal a constat în semințe de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) cultivarul Heintz 2274, respectiv, semințe de ceapă (*Allium cepa*) soiul Rijnsburger. Tratamentele bacteriene au constat în imersia semințelor timp de 20 min în suspensie bacteriană, suplimentată cu ligand pentru aderarea la suprafața seminală. 31
33

Tulpina bacteriană OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost testată comparativ cu alte tulpini bacteriene. În experimentul realizat în seră, pentru combaterea infecțiilor cu FORL la tomate, tulpina OS17 au fost testată în paralel cu alte 9 tulpini bacteriene, și anume: *Bacillus amyloliquefaciens* BW, *Bacillus pumilus* OS 15, *Bacillus subtilis* 113, *Bacillus sp.* 77.1s și 84.5, *Mycobacterium alvei* 82.1s, *Pseudomonas chlororaphis* Sal.c2 și *Pseudomonas fluorescens* WCS 365. În cel de-al doilea experiment, realizat în camera de creștere față de *R. solani* la tomate, împreună cu tulpina OS 17 au fost testate *B. pumilus* OS 15, *B. subtilis* 98a și Us.a2 și *Mycobacterium alvei* 82.1s. În cel de-al treilea experiment, realizat în camera de creștere față de *S. cepivorum* la ceapă, împreună cu OS 17 au mai fost testate 5 tulpini bacteriene, și anume: *B. amyloliquefaciens* BW, *B. pumilus* OS15, *B. subtilis* 98a și Us.a2, și *Pseudomonas chlororaphis* Sal.c2. 35
37
39
41
43

În cadrul experimentelor, concomitent cu variantele de tratament biologic, au fost pregătiți câte trei martori: un control pozitiv, în care solul nu a fost infectat și la care nici nu au fost aplicate tratamente; un control negativ, netratat, dar cu infecție artificială (cu inocul fungic) și un martor chimic, tratat cu Topsin 500SC aplicat la sol în concentrație de 0,14% pentru combaterea fitopatogenilor la tomate, respectiv, 0,25% pentru combaterea putregaiului alb al cepei. 45
47
49

RO 129512 B1

1 Experimentele au fost analizate după 3 săptămâni de la semănat, în vederea
determinării eficacității de combatere biologică a ciupercilor fitopatogene. Pentru analizare,
3 plantele au fost dislocate din substrat, în mod gentil, iar rădăcinile au fost spălate de pământ
pentru a putea vizualiza simptomele caracteristice de infecție. Stabilirea eficacității
5 tratamentelor a fost determinată comparativ cu martorul negativ (infectat și netratat) prin
utilizarea algoritmului de calcul propus de ABBOT (1925).

7
9 *Tabelul 5*

*Eficacitatea diferitelor tulpini bacteriene în prevenirea atacului cu Fusarium oxysporum
fsp. radialis lycopersici la tomate*

Varianta experimentală	Procentul de plante infectate	Eficacitatea tratamentului (%) - algoritm Abbot -
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17	7,41	88,01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	11,11	82,01
<i>Bacillus pumilus</i> OS 15	11,11	82,01
<i>Bacillus subtilis</i> 77.3	46,43	24,83
<i>Bacillus sp.</i> 77. Is	25,81	58,22
<i>Bacillus sp.</i> 84.5	25	59,52
<i>Mycobacterium alvei</i> 82.1 s	38,10	38,32
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> Sal.c2	26,67	56,82
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS 365	24,14	60,92
Martor chimic 0,14% Topsin 500SC	15,38	75,09
Martor pozitiv	0	100
Martor negativ (FORL)	61,76	0

25
27 *Tabelul 6*

*Eficacitatea diferitelor tulpini bacteriene în prevenirea atacului produs
de Rhizoctonia solani la tomate*

Varianta experimentală	Eficacitatea tratamentului (%) - algoritm Abbot -
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17	37,5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	37,5
<i>Bacillus pumilus</i> OS 15	37,5
<i>Bacillus subtilis</i> Us.a2	12,5
<i>Bacillus subtilis</i> 98a	50,0
<i>Mycobacterium alvei</i> 82.1 s	37,5
Martor chimic 0,14% Topsin 500SC	37,5
Martor pozitiv	100
Martor negativ (R. solani)	0

*Eficacitatea diferitelor tulpini bacteriene în prevenirea atacului produs
de Sclerotium cepivorum la ceapă*

Varianta experimentală	Eficacitatea tratamentului (%) - algoritm Abbot -	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17	90	5
<i>Bacillus pumilus</i> OS 15	80	
<i>Bacillus subtilis</i> Us.a2	40	7
<i>Bacillus subtilis</i> 98a	80	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> Sal.c2	50	9
Martor chimic 0,25% Topsin 500SC	90	
Martor pozitiv	100	11
Martor negativ (<i>S.cepivorum</i>)	0	

Determinarea eficacității (%) tratamentelor cu tulpina bacteriană OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* în combaterea atacului ciupercilor fitopatogene menționate a reflectat următoarele:

Tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a prezentat o bună capacitate de prevenire a infecțiilor produse de *Fusarium oxysporum f.sp. radicum-lycopersici*. Tratamentul la sămânță cu această tulpină bacteriană a prezentat o eficacitate mai ridicată în prevenirea putregaiului rădăcinilor și al coletului la tomate, comparativ cu tratamentul chimic aplicat la sol (tabelul 5). De asemenea, tulpina OS 17 a prezentat cea mai bună eficacitate de combatere a infecțiilor cu FORL dintre toate variantele biologice de tratament avute în studiu.

Bacillus amyloliquefaciens OS 17 a prezentat o eficacitate de prevenire a infecțiilor produse de *Rhizoctonia solani* la tomate, comparabilă cu aceea a tratamentului chimic cu metil tiofanat aplicat la sol (tabelul 6).

Bacillus amyloliquefaciens OS 17 a prezentat o eficacitate comparabilă cu aceea a tratamentului chimic aplicat la sol (tabelul 7). Dintre tratamentele biologice avute în studiu, bacterizarea semințelor de ceapă cu tulpina OS 17 a condus la cele mai bune rezultate în condițiile experimentale menționate.

Exemplul 6

Tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost caracterizată în ceea ce privește producerea unor enzime litice care contribuie la activitatea de control biologic, întrucât pot fi implicate în degradarea pereților fungici.

Activitatea celulazică a fost determinată prin descompunerea substratului de carboximetil-celuloză (CMC). Tulpina bacteriană OS 17 a fost însămânțată pe mediu de cultură suplimentat cu 0,5% CMC. După 3 zile de incubare la 30°C, activitatea celulazică a fost apreciată vizual în urma tratării plăcilor cu soluție apoasă 0,3% roșu de Congo.

Prezența unei zone clare a indicat producerea de celule și hidroliza substratului de CMC colorat în roșu.

Producerea de chitinaze a fost analizată prin descompunerea substratului CC-RBB (Chitină Cloidală tratată cu Remazol Brilliant Blue R®). Tulpina OS 17 a fost cultivată în trei etape consecutive pe mediul propus de Rojas Avelizapa și colab. (1999), ulterior a fost însămânțată în același mediu, suplimentat cu 2% CC-RBB w/v ca sursă de carbon. Pentru stabilirea activității chitinolitice, la intervale fixe de timp, pe o perioadă de 4 zile, din cultură a fost

RO 129512 B1

1 recoltată suspensie, supusă centrifugării și cuantificării spectrofotometrice la 595 nm a colo-
3 rantului eliberat prin degradarea chitinei, comparativ cu un martor de mediul neinoculat; o
unitate chitinolitică reprezentând cantitatea de enzimă ce induce o creștere a absorbantei
cu 0,01 unități.

5 Producerea de enzime proteolitice a fost pusă în evidență prin testul hidrolizei
cazeinei din lapte. Tulpina OS 17 a fost inoculată pe mediu de cultură preparat din 50 ml
7 lapte degresat și 2,5 g agar în 100 ml apă distilată. După incubarea plăcilor la 28°C, acestea
au fost analizate timp de 10 zile pentru măsurarea haloului de hidroliză a caseinei din lapte
9 și pentru aprecierea producerii de proteaze.

11 Rezultatele testelor au demonstrat că tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens*
este producătoare de enzime litice precum: celuloze, chitinaze și proteaze.

Exemplul 7

13 Tulpina OS 17 a fost caracterizată ca fiind capabilă să colonizeze substratul vegetal
compus din resturi vegetale din cultura grâului (paie). Această caracteristică creează oportu-
15 nitatea de a utiliza acest material în tehnologiile de mulcire și reconversie a resturilor vege-
tale lignocelulozice, fără a crea riscuri fitosanitare, întrucât tulpina OS 17 de *Bacillus*
17 *amyloliquefaciens* prezintă proprietăți antifungice. Analiza a fost realizată printr-o metodă
respirometrică prin care s-a urmărit consumul de oxigen în substratul compus din paie de
19 grâu dezinfectate, inoculate cu suspensie bacteriană. Pentru realizarea experimentului au
fost parcurse următoarele etape: paiele de grâu au fost tocate și măcinate cu ajutorul unui
21 blender, iar ulterior au fost ambalate și dezinfectate prin iradiere gama (la 1RASM, IFIN,
București). Paiele au fost apoi umectate cu soluție tampon, iar în variantele bacterizate au
23 fost umectate cu suspensie de *Bacillus amyloliquefaciens* OS 17 în soluție tampon fosfat
salin, în concentrație finală de 4×10^4 ufc/ml. Ca martor pozitiv, a fost utilizată o cultură
25 bacteriană obținută în condiții similare pe substrat nutritiv lichid Luria Bertani. Probele au fost
incubate timp de 72 h la 28°C, apoi analizate timp de 3 h la respirometrul Strathtox
27 (Stratkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie).

29 Activitatea respiratorie a tulpinii OS 17 cultivată în substrat de paie de grâu este pre-
zentată în tabelul 8, comparativ cu cei doi martori utilizați. Rezultatele demonstrează
31 existența unei activități biologice intense, corelată cu utilizarea substratului lignocelulozic și,
deci, cu biodegradarea materialului vegetal.

33 Tabelul 8

35 *Activitatea respiratorie a tulpinii OS 17 de B. amyloliquefaciens pe substrat compus din*
resturi vegetale (paie de grâu) ca unică sursă de carbon

Varianta experimentală	Media repetițiilor	Respirația (mg O ₂ /L)
Martor negativ - substrat vegetal neinoculat	MR	0,05 ± 0,01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17 - pe substrat vegetal	MR1	2,36 ± 0,03
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17 - pe substrat vegetal	MR2	2,30 ± 0,09
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17 - pe substrat vegetal	MR3	2,52 ± 0,13
Martor pozitiv - OS 17 în mediu nutritiv	MR	2,70 ± 0,32

43 Determinarea activității respiratorii a tulpinii OS 17 cultivată pe substrat vegetal ligno-
45 celulozic (ca unică sursă de carbon) a condus la rezultate cu valori apropiate de martorul
pozitiv, în care această tulpină a fost cultivată în mediu bogat în nutrienți. Acest fapt demon-
47 strează că tulpina OS 17 de *B. amyloliquefaciens* se poate dezvolta pe substratul vegetal
compus din paie de grâu.

RO 129512 B1

Comparând aceste rezultate cu cele ale tulpinii Us.a2 de *B. subtilis* cultivată pe resturi vegetale (DSM 23654; Cerere de brevet OSIM A/01158/24.11.2010) tulpina OS 17 de *B. amyloliquefaciens* cultivată pe resturi vegetale de *Triticum aestivum* (paie de grâu) are o mai bună capacitate de colonizare a substratului vegetal. Corelând aceste rezultate cu activitatea fungistică a acestei tulpini bacteriene, se poate spune că tulpina OS 17 de *B. amyloliquefaciens* poate fi utilizată ca agroinoculant supresiv în culturile mulcite cu material vegetal.

Exemplul 8

Evaluarea capacității de bioremediere a solurilor poluate cu hidrocarburi a tulpinii OS 17 de *B. amyloliquefaciens* a fost pusă în evidență prin trei teste *in vitro*, și anume tehnica dispersării petrolului, determinarea activității de emulsionare a petrolului, și cuantificarea indicelui de emulsionare a petrolului.

Activitatea de dispersie a petrolului de către tulpina OS 17 a fost pusă în evidență prin metoda dezvoltată de Morikawa și colab. (2000) pentru evidențierea microorganismelor producătoare de biosurfactanți. Dispersia hidrocarburilor a fost evaluată pe kerosen și kerosen cu 20% motorină. Testul a fost realizat în plăci Petri, de 15 cm în diametru, încărcate cu 40 ml apă distilată și 50 μl substanțe grase. Peste pelicula de petrol au fost adăugați 20 μl supernatant bacterian obținut prin centrifugare din culturi în mediu lichid McKeen. Gradul de dispersare a substanțelor grase a fost cuantificat prin măsurarea diametrului zonei clare dezvoltate după adăugarea supernatantului. Prezența surfactanților în supernatantul bacterian a condus la îndepărtarea peliculei de petrol (tabelul 9), determinând formarea unei zone clare împrejurul punctului de inoculare. Testul a fost realizat în triplicat, utilizând ca martor negativ probe similare tratate cu apă distilată. Tulpina OS 17 a fost analizată comparativ cu alte 4 tulpini bacteriene.

Tabelul 9

Abilitatea surfactanților bacterieni de a dispersa petrolul

Tulpina bacteriană	Kerosen	Kerosen cu 20% motorină	Kerosen	Kerosen cu 20% motorină
	Zona de dispersie (mm)		Aria zonei de dispersie (cm ²)	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17	30	27	7,07	5,72
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	18	15	2,54	1,77
<i>Bacillus pumilus</i> OS 15	14	12	1,54	1,13
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	13	12	1,33	1,13

Din datele prezentate în tabelul 9, se poate remarca faptul că, între tulpinile bacteriene testate, pe ambele tipuri de substrat, cele mai bune rezultate s-au obținut cu *B. amyloliquefaciens* OS 17; însă, comparativ cu rezultatele raportate în literatură la experimente similare, proprietățile tulpinii OS 17 sunt medii. În experimentele făcute pe kerosen, petrol și motorină, de către Priya și Usharani (2009), Olteanu (2011) cu difetite tulpini de *Bacillus subtilis*, valorile obținute au fost de 17...56 mm la diametrul zonei de dispersie a kerosenului.

Activitatea de emulsionare a fost cuantificată prin două metode: spectrofotometric, prin măsurarea densității optice la 540 nm (Lee și colab., 2006; Satpute și colab., 2008) și biometric, prin determinarea stabilității emulsiei după 24 h și calcularea indicelui de emulsionare (E_{24}) (Priya și Usharani, 2009).

RO 129512 B1

Pentru determinarea spectrofotometrică a capacității de emulsionare a substraturilor uleioase câte 2 ml de supernatant bacterian au fost distribuiți în tuburi cu 2 ml apă distilată și 1 ml substrat uleios. Probele au fost vortexate viguros timp de 2 min, apoi lăsate în repaus timp de 1 h, pentru separarea fazei apoase de faza uleioasă, înainte de a realiza citirea absorbantei la 540 nm (Lee și colab., 2006; Satpute și colab., 2008). Determinarea capacității de emulsionare a fost realizată prin analiza spectrofotometrică a fazei apoase (Sifour și colab., 2005).

Pentru determinarea indicelui de emulsionare (E_{24}), probele au fost pregătite conform procedurii anterioare, iar calcularea indicelui a fost realizată cu formula:

$$E_{24} = \frac{\text{înălțimea_stratului_emulsionat_ (mm)}}{\text{înălțimea_totală_a_coloanei_de_lichid_ (mm)}} \times 100$$

Rezultatele obținute în urma determinărilor spectrofotometrice la lungimea de undă de 540 nm pentru stabilirea capacității de emulsionare a hidrocarburilor menționează tulpina OS 17 ca având cea mai bună activitate (tabelul 10).

Tabelul 10

Activitatea de emulsionare a diferite substraturi de către biosurfactanții produși de tulpinile bacteriene studiate

Hidrocarburi	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17	<i>Bacillus amyloliquefacien</i> s BW	<i>Bacillus pumilus</i> OS 15	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Activitatea de emulsionare determinată prin citirea densității optice la 540 nm				
Kerosen	0,441	0,180	0,100	0,110
Kerosen cu 20% motorină	0,737	0,227	0,183	0,038

Dintre tulpinile analizate, OS 17 a prezentat cele mai bune rezultate în emulsionarea hidrocarburilor. Activitatea de emulsionare prezentată de această tulpină este comparabilă cu a altor tulpini de *B. subtilis* citate în literatură (Lee și colab., 2006) și superioară activității de emulsionare a kerosenului, menționată de Sifour și colab. (2005) la tulpinii B6 de *B. subtilis*, unde au obținut valoarea de 0,30 A.

Datele obținute prin calcularea indicelui de emulsionare (E_{24}) susțin rezultatele obținute la testele anterioare, astfel că tulpina OS 17 a prezentat cea mai ridicată valoare a indicelui de emulsionare a kerosenului și kerosenului cu 20% motorină (tabelul 11).

Tabelul 11

Indicele de emulsionare a patru compuși uleioși supuși tratării cu diferite extracte bacteriene ce conțin biosurfactanți

Tulpina bacteriană	Kerosen	Kerosen cu 20% motorină
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS 17	75,01	62,20
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	64,03	53,05
<i>Bacillus pumilus</i> OS 15	60,37	51,22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	51,22	47,56

RO 129512 B1

Tulpina OS 17 prezintă un indice de emulsionare ridicat, comparativ cu celelalte tulpini bacteriene avute în studiu, cea mai ridicată activitate fiind față de kerosen (75,05%). Comparând rezultatele obținute cu cele prezentate în literatură, se poate spune că tulpina OS 17 prezintă o activitate de emulsionare superioară față de alte tulpini de *Bacillus* menționate în literatură, astfel că Haddad și colab. (2009) au obținut la *B. subtilis* HOB2 un indicele de emulsionare față de kerosen de 68%, iar Nasr și colab. (2009) au arătat că *B. subtilis* SN1 produce biosurfactanți cu un indice de emulsionare de 53,59% față de kerosen. Față de rezultatele obținute de Satpute și colab. (2008), unde E24 a fost de 40% la *B. subtilis* MTCC 1427, respectiv, 78% la *B. subtilis* MTCC 2473 față de kerosen, cu tulpina OS 17 de *B. amyloliquefaciens* s-a obținut o valoare intermediară de 75,01%, însă, față de tulpinile de *B. subtilis* menționate de Priya și Usharani (2009), la care indicele de emulsionare (E_{24}) a avut valori cuprinse între 43...52% pentru kerosen, tulpina OS 17 a prezentat o activitate de emulsionare net superioară (75%).

Tulpina OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a demonstrat că are calități de agent de combatere biologică față de un număr mare de fungi fitopatogeni, precum *Alternaria sp.*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum f.sp. cepae*, *Fusarium oxysporum f.sp. radidis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*. De asemenea, această tulpină bacteriană prezintă efect inhibitor asupra sporulării și germinării conidiilor de *Fusarium oxysporum f.sp. radidis-lycopersici*, ceea ce contribuie la reducerea propagării infecțiilor cu acest patogen la tomate.

Tulpina OS 17 produce chitinază, celulază și protează, enzime litice implicate în degradarea pereților celulari fungici, fiind astfel capabilă să reducă presiunea de infecție a plantelor cu ciuperci fitopatogene.

Bacillus amyloliquefaciens OS 17 a dovedit că are capacitatea de a coloniza substratul vegetal compus din resturi vegetale din cultura grâului. Acest fapt asociat capacității de limitare a creșterilor miceliene și inhibare a sporulării și germinării conidiilor de *Fusarium* sugerează posibilitatea reconversiei resturilor vegetale *in situ* (sub formă de mulci vegetal) fără a genera riscuri fitosanitare culturilor mulcite.

Utilizarea tulpinii OS 17 de *Bacillus amyloliquefaciens* (înscrisă în colecția de microorganisme NCAIM cu număr de depozit (P) B 001415) ca agroinoculant pentru protecția plantelor horticole prin tratamente aplicate la sol, sămânță sau mulci din resturi vegetale reprezintă o soluție alternativă la utilizarea pesticidelor pentru prevenirea infecțiilor cu ciuperci fitopatogene de sol. De asemenea, această tulpină poate fi utilizată ca ameliorator de sol pentru bioremedierea terenurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere.

Realizarea invenției revendicate este ilustrată în soluțiile expuse (prezentate) mai sus, în vederea utilizării tulpinii de *Bacillus amyloliquefaciens* OS 17 ca tratament la sol, sămânță sau în mulci vegetal, ca agroinoculant sau ca ameliorator de sol pentru bioremedierea terenurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere.

Prezența invenției, ce face referire la tulpina de *Bacillus amyloliquefaciens* OS 17, este susceptibilă a fi aplicată ca agroinoculant pentru tratamente la sol, sămânță sau mulci din resturi vegetale, în vederea reducerii presiunii de infecție a plantelor cu ciuperci fitopatogene de sol, și ca ameliorator al terenurilor contaminate cu hidrocarburi.

RO 129512 B1

1

Revendicare

3

Tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens* OS 17, cu număr de acces NCAIM (P) B 001415, antagonistă față de ciuperci fitopatogene de sol care produc ofilirea și căderea plantelor în primele stadii de vegetație sau infestarea produselor horticole înainte de recoltare: *Alternaria sp.*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum f.sp. cepae*, *Fusarium oxysporum f. sp. radices-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*, datorită producerii de enzime hidrolitice, capabile să degradeze pereții celulari fungici, a sintezei de compuși cu activitate antifungică și de biosurfactanți cu activitate de emulsionare a hidrocarburilor petroliere.

5

7

9

11



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 441/2017