



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENTIE

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

(22) Data de depozit: **07.12.2012**

(41) Data publicării cererii:  
**30.06.2014** BOPI nr. **6/2014**

(71) Solicitant:

• 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 1, 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

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

(57) Rezumat:

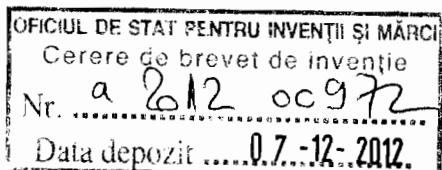
Invenția se referă la o tulpină de *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizată ca ameliorator al terenurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere. Materia conform invenției, tulipina de *Bacillus amyloliquefaciens* OS17, are codul de depozitare NCAIM (P) B 001414, este antagonist față de ciuperci fitopatogene de sol, care produc ofilirea și

cădere plantelor în primele stadii de vegetație, sau infestarea produselor horticole înainte de recoltare, având activitate de emulsionare a unor hidrocarburi petroliere.

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 inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





**Tulpina de *Bacillus amyloliquefaciens* cu potențial de utilizare ca agroinoculant în substraturile cu risc fitosanitar ridicat și ameliorator al terenurilor contaminate cu hidrocarburi petroliere**

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, în vederea reducerii presiunii de infecție a plantelor cu ciuperci fitopatogene de sol. De asemenea, tulipa menționată este destinată utilizării ca ameliorator al terenurilor contaminate cu hidrocarburi. Această tulipă a fost obținută prin selecție controlată, fără utilizarea de agenți mutageni, fiind izolată din microbiota prezentă în mod natural în rizosfera de ceapă (*Allium cepa* L.).

Sunt brevetate mai multe tulpi de *Bacillus amyloliquefaciens* cu proprietăți antifungice destinate combaterii ciupercilor patogene plantelor de cultură. Brevetul US 6,960,342 B2 (2005) descrie tulipa B190 de *B. amyloliquefaciens* cu activitate de protejare a plantelor de cultură față de un spectru larg de fungi fitopatogeni. Brevetul US 7,615,366 B2 (2009) descrie tulipa KTG0202 de *B. amyloliquefaciens* (număr de colecție KCTC 10564BP) cu spectru antifungic variat, cu bună eficacitate în combaterea fainărilor la plante și care inhibă infecția cu TMV (Virusul Mozaicului Tutunului). Cererea de brevet 20100143316/2010 prezintă tulipa Ba-BPD1 de *B. amyloliquefaciens* (număr de colecție DSM21836) producătoare de enzime litice și antibiotice, cu activitate de biodegradare și proprietăți antifungice. Brevetul US2001/0274673 A1 se referă la tulipa NRRL B-50350 de *B. amyloliquefaciens* producătoare de enzime litice, capabilă să degradeze diferiți compuși oleaginoși precum (grăsimi, unsori, uleiuri de uz alimentar) și cu activitate fungicidă și fungistatică. În ceea ce privește degradarea compușilor petrolieri, nu au fost brevetate tulpi de *Bacillus amyloliquefaciens* cu astfel de proprietăți, ci numai tulpi ale altor specii. Brevetul US 4415661/1983 menționează tulipa ATCC20614 de *Geotrichum marinum* și metode de cultivare acesteia pentru degradarea compușilor petrolieri. Nu s-au descris însă până acum tulpi de *B. amyloliquefaciens* care să prezinte concomitent un spectru larg de acțiune antifungică, care să reducă presiunea de infecție la plante prin producerea de enzime litice, inhibitori ai formelor de sporulare a ciupercilor patogene, cu capacitate de colonizare și bioconversie a substraturilor vegetale greu mineralizabile și activitate de diminuare a contaminării cu hidrocarburi petroliere.

Tulpina OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* (număr de depozit NCAIM (P) B 001415) prezintă un spectru larg de acțiune antifungică față de ciupercile fitopatogene de sol care produc ofilirea și căderea plantelor în primele stadii de vegetație și infestarea produselor horticole înainte de recoltare (*Alternaria sp.*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea*,

P0

*Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*), totodata având și activitate de emulsionare a hidrocarburilor petroliere datorită producerii de biosurfactanți.

Tulpina *Bacillus amyloliquefaciens* OS17 prezintă următoarele avantaje:

- creștere bogată pe medii nutritive uzuale utilizate pentru creșterea bacteriilor gram pozitive sporulate;
  - formare de spori cu viabilitate îndelungată și rezistență la condiții de stress termic;
  - spectru larg de acțiune împotriva atacului ciupercilor fitopatogene de sol;
  - capacitate de bioconversie a resturilor vegetale, cu formare de compuși biologic activi, capabili să reducă riscul de contaminare cu fungi fitopatogeni prin inhibarea creșterilor miceliene și a germinării sporilor fungici
  - capacitate de emulsionare a hidrocarburilor petroliere datorită producerii de biosurfactanți.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă prezenta inventie este ilustrată prin exemplele prezentate mai jos, în care sunt descrise procedeele de punere în evidență a proprietăților tulpini OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* de a diminua riscul de infecție cu fungi fitopatogeni și de a reduce încărcătura de hidrocarburi în substraturile poluate cu derivați ai petrolului (kerosen, motorină).

**Exemplul 1.** Tulpina OS17 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 producerii de biosurfactanți cu activitate de emulsionare a hidrocarburilor petroliere.

În vederea încadrării taxonomice tulipina OS17 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* OS17 pe diferite medii nutritive după de 24 ore de cultivare.

Mediu de cultură utilizat		Morfologia coloniilor tulpinii OS17 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 neregulat 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	Dezvoltare preferențială la suprafața mediului de cultură.

	(NB)	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 abundantă. La suprafața mediului de cultură, în zona de maximă aerare, formează o peliculă de culoare bej, ce se extinde în biofilm pe peretii vasului de cultură. În timp, din peliculă se desprinde biomasă și se creează sediment.

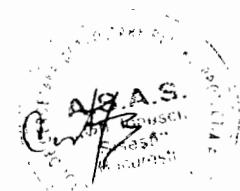
Tab. 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii OS17.

Testul biochimic	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17
Reacția Gram	+/- variabil
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Solubilizare fitat de sodiu	-
Hidroliza gelatinei	+
Hidroliza argininei	-
Reducerea $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$	+
Creștere anaerobă	-
Motilitate de migrare	+
Motilitate de agregare	+
Producere de biofilm	+
Producere de siderofori	+
Catalază	+
Surse de carbon:	
Glucoză	+
Fructoză	+
Manoză	+
Sucroză	+
Celobioză	+
Malonat	-
Citrat	-
Toleranța la NaCl 7%	+

Pentru încadrarea taxonomică prin tehnica ITS-PCR au fost utilizati 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 OS17 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 OS17 prin parcurgerea următoarelor etape: cultivarea timp de 18 ore 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;



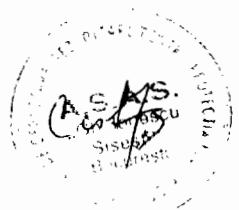
prepararea suspensiei bacteriene în fluid de inoculare de tip B, până la atingerea transmitanței de 97% la 590nm; inocularea acesteia în microplăci de tip Biolog GEN III, câte 100µl/godeu; incubarea la 33°C pentru 22 de ore; determinarea profilului fenotipic al tulpinii prin citirea densității optice la 590nm și 750nm 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 OS17 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. *radicis-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. *radicis-lycopersici*; producerii de enzime litice precum cellulaze, chitinaze și proteaze, implicate în degradarea pereților fugici; mobilității de migrare/*swimming* și agregare/*swarming*; formării de biofilm *in vitro*; capacitatea de colonizare a resturilor vegetale lignocelulozice și activitatea de protecție a plantulelor de tomate, respectiv ceapă față de infecțiile cu *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-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 OS17 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. *radicis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*.

Testarea *in vitro* a calităților antifungice ale tulpinii OS17 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 rondele miceliene calibrate cu predecea 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 OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* față de fungii fitopatogeni analizați**

Ciuperca fitopatogenă	Zona clară de inhibiție (mm) indusă de OS17 după 5 zile de incubare	Eficacitatea antagonistă (%) indusă de OS17 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</i> f.sp. <i>cepae</i>	6	60
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-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 ca tulpina OS17 produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea ciupercilor fitopatogene luate în studiu. Spectrul de acțiune fiind vast.

*Exemplul 3.* Tulpina OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost testată *in vitro* pentru determinarea capacitații de inhibare a sporulării ciupercii *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis 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* OS17.

Testul a fost realizat în baloane Erlenmayer de 50 ml încărcate cu 10 ml mediu lichid per probă. Inițial a fost obținută cultura bacteriană, prin incubare 18 h la 28°C cu agitare de 150 rpm. Cultura bacteriană a fost filtrată prin membrană sterilă de 0,22 µm pentru îndepărțarea celulelor bacteriene, iar supernatantul a fost utilizat pentru testul de inhibare a sporulării ciupercii. Simultan au fost pregătite flacoane martor cu mediu de cultură nebacterizat. Probele au fost apoi inoculate cu patogenul testat. În fiecare flacon au fost plasate câte două rondele de miceliu fungic (6 mm diametru) cu creștere de aceeași vîrstă. Capacitatea de inhibare a sporulării ciupercii de către tulpina bacteriană OS17 a fost analizată comparativ cu un martor chimic reprezentat de TOPSIN 500SC (tiofanat metil 500g/l), un fungicid sistemic omologat pentru combaterea fitopatogenului analizat, pesticid utilizat în concentrație finală de 0,14%, conform recomandărilor menționate de producător pentru combaterea acestui patogen. Ca martor, au fost utilizate culturi ale aceleiași ciuperci, obținute în condiții similare, lipsite de tratament. Cuantificarea sporulării a fost făcută după 3, respectiv 5 zile de incubare la 28°C, sub



agitare la 150 rpm, prin determinarea numărului de spori prezenți în suspensie, utilizând camera Neubauer. Testul a fost realizat în 3 repetiții, rezultatele fiind prezentate în tabelul 4.

**Tablelul 4. Inhibarea sporulării ciupercii *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL)**

Varianta experimentală	Concentrația de spori (spori/ml)	
	după 3 zile	după 5 zile
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17	$1,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
Tratament chimic	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
Martor netratat (FORL)	$5,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$

**Exemplul 4.** Determinarea capacitatei de întârziere a germinării sporilor de *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* ZUM 2407 (FORL) manifestat de tulpina OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a fost testată *in vitro* pe lame sterile de sticlă încărcate cu mediu CGA dispus în strat uniform, subțire, câte 100µl mediu/probă. Aceste suprafete de mediu au fost inoculate prin imersie, cu câte 10µl suspensie conidii, în concentrație de  $2 \times 10^6$  spori de FORL/ml. Cantitatea de spori în spoturile de mediu fiind de  $2 \times 10^4$  spori de FORL/probă. Tratamentele bacteriene au constat în aplicarea a 20µl supernatant bacterian filtrat inoculat prin imersie pe suprafața mediului. Filtratul bacterian a fost obținut din culturi de 48 h obținute în mediu lichid, centrifugate și filtrate prin membrană de 0,22 µm (MILLEX®GP) pentru îndepărtarea celulelor bacteriene.

Lamele au fost incubate în plăci Petri sterile, la temperatura camerei, timp de 3 h. Analizarea probelor a fost realizată la microscopul optic (MC1 IOR), utilizând obiectivul de 40X. Imaginele captate au fost preluate cu o cameră de luat vederi (Model GN-B100/SA/W5, Gen Security) și folosite pentru analiza imagii prin utilizarea programului APS Assess 2.0. Acest soft a permis determinarea lungimii filamentelor miceliene dezvoltate prin germinarea sporilor. Aprecierea tratamentelor bacteriene în ceea ce privește gradul de inhibare a germinării sporilor de FORL a fost realizată prin analiza comparativă cu creșterile miceliene dezvoltate pe lamele martor (fără tratament). Testul a fost repetat de trei ori.

Tratamentul cu supernatant bacterian filtrat provenit de la *B. amyloliquefaciens* OS17 a condus la întârzierea germinării sporilor de FORL, cu o eficacitate de 82,8% în diminuarea lungimii filamentelor miceliene, comparativ cu martorul fără tratament.

Efectul inhibitor manifestat de tulpina OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* asupra sporulării ciupercii și germinării conidiilor de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* contribuie la creșterea eficacității de combatere a patogenului și la reducerea propagării infecțiilor.



**Exemplul 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. *radicis 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.

Operațiile implicate au constat în pregătirea inoculului bacterian prin cultivare în mediu lichid Luria Bertani (aerat prin agitare la 150rpm și incubare la 28°C, timp de 2-3 zile), preluarea biomasei și realizarea suspensiilor bacteriene cu titrul de  $10^8$  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  $10^6$  microconidii/ml pentru *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, fie prin cultivarea ciupercilor *Rhizoctonia solani*, respectiv *Sclerotium cepivorum* în plăci Roux, pe mediul din boabe de orz dezinfecțiate prin dublă autoclavare la 121°C timp de 30 minute, 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 râme, argilă și nisip de râu, în proporții variabile (pH 6,5-7), dezinfecțiat înainte de utilizare, prin expunere la radiații ionizante gamma, în doză de 25 KGy.

În experimentul realizat în seră pentru prevenirea atacului de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis 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 subsrat în proporție de 2%.

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 de minute în suspensie bacteriană suplimentată cu ligand pentru aderarea la suprafața seminală.

Tulpina bacteriană OS17 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* OS15, *Bacillus subtilis* 77.3, *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 OS17 au fost testate *B. pumilus* OS15, *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



OS17 au mai fost testate 5 tulpi bacteriene și anume: BW de *B.amyloliquefaciens*, OS15 de *B. pumilus*, 98a și Us.a2 de *B. subtilis* și Sal.c2 de și Sal.c2 de *Pseudomonas chlororaphis*.

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, nefratacă 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.

Experimentele au fost analizate după 3 săptămâni de la semănat în vederea determinării eficacității de combatere biologică a ciupercilor fitopatogene. Pentru analizare, 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 tratamentelor a fost determinată comparativ cu martorul negativ (infectat și nefratacă) prin utilizarea algoritmului de calcul propus de ABBOT (1925).

Tabelul 6. Eficacitatea diferitelor tulpi bacteriene în prevenirea atacului cu *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* la tomate

Varianta experimentală	Procentul de plante infectate	Eficacitatea tratamentului (%) – algoritm Abbot –
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17	7,41	88,01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	11,11	82,01
<i>Bacillus pumilus</i> OS15	11,11	82,01
<i>Bacillus subtilis</i> 77.3	46,43	24,83
<i>Bacillus</i> sp. 77.1s	25,81	58,22
<i>Bacillus</i> sp. 84.5	25	59,52
<i>Mycobacterium alvei</i> 82.1s	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

Tabelul 7. Eficacitatea diferitelor tulpi bacteriene în prevenirea atacului produs de *Rhizoctonia solani* la tomate

Varianta experimentală	Eficacitatea tratamentului (%) – algoritm Abbot –
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17	37,5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	37,5
<i>Bacillus pumilus</i> OS15	37,5
<i>Bacillus subtilis</i> Us.a2	12,5
<i>Bacillus subtilis</i> 98a	50,0
<i>Mycobacterium alvei</i> 82.1s	37,5
Martor chimic 0,14% Topsin 500SC	37,5
Martor pozitiv	100
Martor negativ ( <i>R.solani</i> )	0



Tabelul 8. 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
<i>Bacillus pumilus</i> OS15	80
<i>Bacillus subtilis</i> Us.a2	40
<i>Bacillus subtilis</i> 98a	80
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> Sal.c2	50
Martor chimic 0,25% Topsin 500SC	90
Martor pozitiv	100
Martor negativ ( <i>S.cepivorum</i> )	0

Determinarea eficacității (%) tratamentelor cu tulpina bacteriană OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* în combaterea atacului ciupercilor fitopatogene menționate, a reflectat următoarele:

➤ Tulpina OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* a prezentat o bună capacitate de prevenire a infecțiilor produse de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis 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 6). De asemenea, tulpina OS17 a prezentat cea mai bună eficacitate de combatere a infecțiilor cu FORL dintre toate variantele biologice de tratament avute în studiu.

➤ *Bacillus amyloliquefaciens* OS17 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 7).

➤ *Bacillus amyloliquefaciens* OS17 a prezentat o eficacitate comparabilă cu aceea a tratamentului chimic aplicat la sol (tabelul 8). Dintre tratamentele biologice avute în studiu, bacterizarea semințelor de ceapă cu tulpina OS17 a condus la cele mai bune rezultate în condițiile experimentale menționate.

**Exemplul 6.** Tulpina OS17 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 carboxi-metil-celuloză (CMC). Tulpina bacteriană OS17 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 celulaze și hidroliza substratului de CMC colorat în roșu.

Producerea de chitinaze a fost analizată prin descompunerea substratului CC-RBB (Chitină Clooidală tratată cu Remazol Brilliant Blue R®). Tulpina OS17 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 sursa de carbon. Pentru stabilirea activității chitinolitice, la intervale fixe de timp o perioadă de 4 zile, din cultură a fost recoltată suspensie, supusă centrifugării și cuantificării spectrofotometrice la 595nm a colorantului eliberat prin degradarea chitinei, comparativ cu un martor de mediul neinoculat. O unitate chitinolică reprezentând cantitatea de enzimă ce induce o creștere a absorbanței cu 0,01 unități.

Producerea de enzime proteolitice a fost pusă în evidență prin testul hidrolizei cazeinei din lapte. Tulpina OS17 a fost inoculată pe mediu de cultură preparat din 50ml lapte degresat și 2,5g 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 cazeinei din lapte și pentru aprecierea producerii de proteaze.

Rezultatele testelor au demonstrat că tulpina OS17 de *Bacillus amyloliquefaciens* este producătoare de enzime litice precum: celulaze, chitinaze și proteaze.

**Exemplul 7.** Tulpina OS17 a fost caracterizată ca fiind capabilă să colonizeze substratul vegetal compus din resturi vegetale din cultura grâului (paie). Această caracteristică creând oportunitatea de a utiliza acest material în tehnologiile de mulcire și reconversie a resturilor vegetale lignocelulozice, fără a crea riscuri fitosanitare, întrucât tulpina OS17 de *Bacillus 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 grâu dezinfecțate, inoculate cu suspensie bacteriană. Pentru realizarea experimentului au fost parcursse următoarele etape: paiele de grâu au fost tocate și măcinate cu ajutorul unui blender, ulterior au fost ambalate și dezinfecțate prin iradiere gama (la IRASM, IFIN, București). Paiele au fost apoi umectate cu soluție tampon, iar în variantele bacterizate au fost umectate cu suspensie de *Bacillus amyloliquefaciens* OS17 în soluție tampon fosfat salin, în concentrație finală de  $4 \times 10^4$  ufc/ml. Ca martor pozitiv a fost utilizată cultură bacteriană obținută în condiții similare pe substrat nutritiv lichid Luria Bertani. Probele au fost incubate timp de 72h la 28°C, apoi analizate timp de 3 ore la respirometrul Strathox (Stratkkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie).

Activitatea respiratorie a tulpinii OS17 cultivată în substrat de paie de grâu este prezentată în tabelul 9, comarativ cu cei doi martori utilizați. Rezultatele demonstrează existența unei activități biologice intense, corelată cu utilizarea substratului lignocelulozic și deci cu biodegradarea materialului vegetal.



Tabelul 9. Activitatea respiratorie a tulpinii OS17 de *B. amyloliquefaciens* pe substrat compus din resturi vegetale (paie de grâu) ca unică sursă de carbon.

Varianta experimentală	Media repetițiilor	Respirația (mg O <sub>2</sub> /L)
Martor negativ – substrat vegetal neinoculat	MR	0,05 ± 0,01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17 – pe substrat vegetal	MR1	2,36 ± 0,03
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17 – pe substrat vegetal	MR2	2,30 ± 0,09
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17 – pe substrat vegetal	MR3	2,52 ± 0,13
Martor pozitiv – OS17 în mediu nutritiv	MR	2,70 ± 0,32

Determinarea activității respiratorii a tulpinii OS17 cultivată pe substrat vegetal lignocelulozic (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 demonstrează că tulpina OS17 de *B. amyloliquefaciens* se poate dezvolta pe substratul vegetal compus din paie de grâu.

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 OS17 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 fungistatică a acestei tulpini bacteriene se poate spune că tulpina OS17 de *B. amyloliquefaciens* poate fi utilizată ca agroinoculant supresiv în culturile mulcite cu material vegetal.

**Exemplul 8.** Evaluarea capacității de bioremeniere a solurilor poluate cu hidrocarburi a tulpinii OS17 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 OS17 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 50µl substanțe grase. Peste pelicula de petrol au fost adăugați 20µl supernatant bacterial 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 îndepărțarea peliculei de petrol (tabel



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 OS17 a fost analizată comparativ cu alte 4 tulpini bacteriene.

**Tabel 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 <sup>2</sup> )		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17	30	27	7,07	5,72
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	18	15	2,54	1,77
<i>Bacillus pumilus</i> OS15	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* OS17, însă, comparativ cu rezultatele raportate în literatură la experimente similare, proprietățile tulpinii OS17 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 ore și calcularea indicelui de emulsionare ( $E_{24}$ ) (Priya și Usharani, 2009).

Pentru determinarea spectrofotometrică a capacității de emulsionare a substraturilor uleioase câte 2ml de supernatant bacterian au fost distribuiți în tuburi cu 2ml apă distilată și 1 ml substrat uleios. Probele au fost vortexate viguros timp de 2 minute, apoi lăsate în repaus timp de 1 oră, pentru separarea fazei apoase de fază uleioasă, înainte de a realiza citirea absorbanței 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:

$$E_{24} = \frac{\text{inaltimea stratului emulsionat (mm)}}{\text{inaltimea totală a coloanei de lichid (mm)}} \times 100$$

Rezultatele obținute în urma determinărilor spectrofotometrice la lungimea de undă de 540 nm pentru stabilirea capacității de emulsionare a hidrocarburilor menționează tulpina OS17 ca având cea mai bună activitate (tabel 10).



**Tabelul 10.** Activitatea de emulsionare a diferite substraturi de către biosurfactanții produși de tulpinile bacteriene studiate

Hidrocarburi	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	<i>Bacillus pumilus</i> OS15	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	Activitatea de emulsionare determinată prin citirea densității optice la 540 nm			
Kerosen	<b>0,441</b>	0,180	0,100	0,110
Kerosen cu 20% motorină	<b>0,737</b>	0,227	0,183	0,038

Dintre tulpinile analizate, OS17 a prezentat cele mai bune rezultate în emulsionarea hidrocarburilor. Activitatea de emulsionare prezentată de acestă tulpină este comparabilă cu a altor tulpi 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 tulipa OS17 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	<b>Kerosen</b>	<b>Kerosen cu 20% motorină</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS17	<b>75,01</b>	<b>62,20</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BW	64,03	53,05
<i>Bacillus pumilus</i> OS15	60,37	51,22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	51,22	47,56

Tulpina OS17 prezintă un indice de emulsionare ridicat comparativ cu celelalte tulpi bacteriene avute în studiu, cea mai ridicată activitate fiind față de kerosen (75,05%). Comparând rezultatele obținute cu cele perezentate în literatură se poate spune că tulipa OS17 prezintă o activitate de emulsionare superioară față de alte tulpi de *Bacillus* menționate în literatură, astfel că Haddad și colab., (2009) au obținut la *B. subtilis* HOB2 un indice 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  $E_{24}$  a fost de 40% la *B. subtilis* MTCC 1427, respectiv 78% la *B. subtilis* MTCC 2473 față de kerosen, cu tulipa OS17 de *B. amyloliquefaciens* s-a obținut o valoare intermedie de 75,01%, însă, față de tulpi 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, tulipa OS17 a prezentat o activitate de emulsionare net superioară (75%).



### Avantajele invenției

Tulpina OS17 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. radicis-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. radicis lycopersici*, ceea ce contribuie la reducerea propagării infecțiilor cu acest patogen la tomate.

Tulpina OS17 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* OS17 a dovedit că are capacitatea de a coloniza substratul vegetal compus din resturi vegetale din cultura grâului. Acest fapt asociat capacitatei 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 OS17 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.



d-2012-00972--

07-12-2012

33  
34

### Revendicări

1. Tulpina de *Bacillus amyloliquefaciens* OS17, având codul de depozitare 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. *radicis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium bataticola* și *Sclerotium cepivorum*, datorită producerii de enzime hidrolitice, capabile să degradeze peretii celulari fungici, a sintezei de compuși cu activitate antifungică și de biosurfactanți cu activitate de emulsificare a hidrocarburilor petroliere.

