



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01380**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27.02.2015** BOPI nr. **2/2015**

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

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

(72) Inventatori:  
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DINU SORINA, BD.ION IONESCU DE LA  
BRAD NR.8, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **CONSTANTINESCU FLORICA,  
STR.EMANOIL PORUMBARU NR.67,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **SICUIA OANA, STR.VICINA NR.3, BL.33,  
SC.3, AP.153, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,  
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**US 5869038; US 2003/0130121 A1**

(54) **TULPINĂ DE SERRATIA PLYMUTHICA CU ACȚIUNE  
ANTAGONICĂ FAȚĂ DE FITOPATOGENII PLANTELOR DE  
CULTURĂ**



# RO 127469 B1

1 Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Serratia plymuthica*, cu acțiuni benefice  
multiple asupra plantelor de cultură, izolată din rizosfera de grâu, destinată aplicării ca  
3 bioinoculant pentru protecția culturilor agricole și pentru biofortifierea recoltei de cereale-  
boabe în zonele cu deficit de seleniu.

5 Sunt cunoscute o serie întreagă de tulpini de *Serratia*, care sunt utile pentru protecția  
plantelor de cultură împotriva agenților dăunători. **US 5869038** descrie tulpini de *Serratia*  
7 (*Serratia plymuthica* CL 43, depozitată la National Collections of Industrial, Food and Marine  
Bacteria, cu numărul NCIMB 40493, și *Serratia liquefaciens* CL 80 NCIMB 40492) care  
9 protejează legumele frunzoase (salată, varză) împotriva ciupercilor producătoare de  
putregaiuri (*Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*). **US 6660263** prezintă tulpina *Serratia*  
11 *martescens* MSU-97 (înregistrată la Centraalbureau voor Schimmel Cultures, cu numărul  
CBS 112860), producătoare de oocidină și care este activă față de o serie de ciuperci  
13 fitopatogene din sol. **WO/2004/049808** expune tulpina de *Serratia marcescens* PRI-2A  
(depozitată la Centraalbureau voor Schimmelcultures, cu numărul CBS 110243), care este  
15 activă față de următoarele categorii de agenți dăunători: bacterii fitopatogene din genul  
*Ralstonia*; ciuperci fitopatogene (*Rhizoctonia solani*); insecte (tripsși, ca de ex. *Frankliniella*  
17 *occidentalis*); acarieni (*Tetranychus urticae*). Cererea de brevet **US 2003/0130121 A1** se  
referă la tulpina A153 de *Serratia plymuthica* (depozitată la National Collections of Industrial,  
19 Food and Marine Bacteria NCIMB, cu numărul 40398), care produce haterumalide A, B, E  
și X (și derivați) și care inhibă creșterea unor ciuperci fitopatogene ca *Sclerotinia sclerotiorum*  
21 și a unor buruieni: *Chaenopodium album*, *Thlapsi arvensis*, *Stellaria media*, *Fumaria*  
*officinalis*.

23 Nu s-au descris până în prezent tulpini de *Serratia* care să prezinte concomitent  
antagonism față de fitopatogeni și capacitate de a stimula preluarea microelementelor de  
25 către plante, în special, seleniu.

Niciuna dintre tulpinile de *Serratia*, revendicate prin brevetele din literatura de  
27 specialitate, nu prezintă descrieri privind inocuitatea pentru organisme neșintă, deși o serie  
de tulpini din genul *Serratia* s-au dovedit a fi patogeni oportuniști pentru om (*Eisenstein*,  
29 2009, cap. 225, *Enterobacteriaceae*, Mandell, G. L., Douglas, R. G., Bennett, J. E., Eds.  
*Phnciples and practice of infectious disease*, ediția a 7-a, Elsevier Scientific, Oxford, 2009,  
31 pg. 1848...1860). Patogenitatea pentru om este datorată producerii de hemolizine (Kurz et  
al., 2003, *The EMBO Journal*, 22:1451-1460, Shimuta et al., 2009, *BMC Microbiology*,  
33 9:261), astfel încât caracterizarea tulpinilor de *Serratia*, propuse pentru utilizare în  
agricultură, ar trebui să includă teste de inocuitate pentru organisme - neșintă.

35 Tulpina de *Serratia plymuthica*, Ps33, înregistrată la National Collection of Agricultural  
and Industrial Microorganisms, Budapesta, cu numărul NCAIM (P) B001366, conform  
37 invenției, are acțiune de protecție *in vivo* a plantelor de cultură față de ciupercile fitopatogene  
de sol *Rhizoctonia solani*, *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium*  
39 *oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia bataticola*,  
*Verticillium dahliae*, și acțiunii antagoniste față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la  
41 înflorit, *Erwinia amylovora*, pseudomonasuri ice<sup>+</sup> prezintă mobilitate ridicată și formează  
biofilme, colonizând suprafețele organelor plantelor și rezistând la factorii adverși de mediu,  
43 stimulează dezvoltarea plantelor de grâu, datorită producerii de compuși volatili și solubilizării  
fosforului, biodisponibilizează seleniul pentru plantele de grâu și porumb, și favorizează  
45 acumularea seleniului în boabele de grâu.

47 Tulpina de *Serratia plymuthica* Ps33, descrisă în prezenta invenție, prezintă  
următoarele avantaje:

- creșterea abundentă pe mediile uzual folosite pentru cultivarea proteobacteriilor;

# RO 127469 B1

- mobilitatea ridicată, care permite colonizarea rapidă a diferitelor suprafețe ale organelor plantelor;	1
- formarea de structuri de tip biofilme pe diferitele suprafețe (inclusiv pe cele delimitate de organele subterane ale plantelor), ceea ce asigură o mai mare rezistență față de factorii de mediu și, implicit, o competență saprofitică superioară în rizosferă;	3
- antagonism pentru o serie de ciuperci fitopatogene de sol, ceea ce permite folosirea, ca bioinoculant, pentru protecția primelor stadii ale plantelor de cultură față de acești agenți fitopatogeni de sol;	5
- antagonism pentru bacteriile care produc boli în timpul înfloritului ( <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pseudomonas ice</i> <sup>+</sup> );	7
- producerea de compuși volatili care stimulează creșterea plantelor; îmbunătățirea nutriției plantelor prin solubilizarea fosforului insolubil anorganic prin producere de acizi organici, solubilizarea fosforului insolubil organic (săruri ale acidului fitic) prin producere de fitaze, biodisponibilizarea seleniului și stimularea preluării și acumulării acestuia de către plantele de grâu și porumb.	9
Tulpina descrisă în prezenta invenție, înregistrată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, cu numărul NCAIM (P) B 001366, are acțiuni benefice multiple asupra plantelor de cultură, inclusiv de protecție față de anumiți agenți fitopatogeni și de stimulare a preluării seleniului de către plantele de grâu și porumb, și nu prezintă patogenitate pentru organisme nețintă.	11
Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos.	13
<b>Exemplu.</b> Tulpina Ps33 de <i>Serratia plymuthica</i> a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, din rizosfera unor plante de grâu ( <i>Triticum aestivum</i> cv. <i>Boema</i> ).	15
Pentru izolare, s-a folosit mediul Nutrient agar, cu următoarea compoziție: peptonă - 5 g, beef extract - 3 g, agar - 18 g, la 1000 ml apă distilată; pH 6,8...7,2. Purificarea bacteriei s-a realizat pe mediul Luria-Bertani (LB), agarizat cu următoarea compoziție: bacto-triptonă - 10 g, extract de drojdii - 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, apă distilată până la 1000 ml, pH corectat la 7,4 cu soluții de NaOH 5 M sau HCl 1 M. Pentru cultivare, s-a folosit mediul LB lichid, bacteriile fiind crescute 1...2 zile, la temperatura de 28°C.	17
Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 150 izolate de bacili gram-negativi, pe baza:	19
- acțiunii antagoniste <i>in vitro</i> și a acțiunii de protecție <i>in vivo</i> a plantelor de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol ( <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotinia bataticola</i> , <i>Verticillium dahliae</i> );	21
- acțiunii antagoniste <i>in vitro</i> și <i>in situ</i> față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit ( <i>Erwinia amylovora</i> , <i>pseudomonasuri ice</i> <sup>+</sup> );	23
- producerii de compuși volatili cu acțiune de stimulare a creșterii plantelor;	25
- acțiunii de solubilizare a fosforului din formele sale insolubile, organice și anorganice;	27
- acțiunii de stimulare a germinației grâului și dezvoltării plantulelor de grâu, ca și de stimulare a preluării și a acumulării seleniului de către plantele de grâu și de porumb;	29
- inocuitate în testul pe <i>Galleria mellonella</i> .	31
În vederea încadrării taxonomice, tulpina Ps33 a fost caracterizată din punct de vedere morfologic (tabelul 1), biochimic - fiziologic (tabelul 2) și pe baza secvenței 16S rADN (tabelul 3).	33

# RO 127469 B1

Tabelul 1

Morfologia coloniilor și a celulelor de *Serratia plymuthica* Ps33 pe mediul LB agarizat, după cultivare timp de 24 h

Caractere morfologice specifice pentru <i>Serratia plymuthica</i> Ps33	
Colonia	forma: circulară
	aspectul suprafeței: netedă, convexă
	transparența: translucidă
	culoarea: alb-gălbui
Celule	forma: bastonaș
	dimensiuni: 0,5...0,8 x 0,9... 2,0 μm
	aranjament flagelar: peritrich

Tabelul 2

Caracteristicile fiziologice ale tulpinii Ps33

Testul biochimic	Ps 33
Reacția Gram	-
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Reducerea NO <sub>3</sub> ->NO <sub>2</sub>	+
Creștere anaerobă	-
Chitinază	+
Oxidază	-
Pectinază	-
Catalaza	+
Lecitinază	+
Sursa de carbon:	
- adonitol	-
- arabinoză	+
- meliboză	+
- D-arabitol	-
- trehaloza	+
- zaharoza	+
- maltoza	+
- glucoza	+
- xiloza	+
- manoza	+
- fructoza	+
- sorbitol	+
- manitol	+
- inozitol	+
- glicerol	+
- meso-eritritol	-
Acidifică:	
- adonitol	-
- glucoza	+
- zaharoza	+
- maltoza	+
- fructoza	+
- arabinoză	+
- manitol	+
- rafinoza	+
- celobioza	+
- ramnoza	-
- sorbitol	-

# RO 127469 B1

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin aplicarea unui protocol de lucru, caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure - colonii izolate, tehnica însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului bacterian; electroforeză în gel pentru detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 16S rADN prin tehnica PCR și electroforeză în gel; purificarea ADN-ului ribozomal; precipitarea și uscarea ADN-ului ribozomal. Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele au fost analizate folosind programul CHROMAS 2.33 (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene NCBI (National Center for Biotechnology Information) s-a realizat cu ajutorul programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Pe baza secvenței de 1299 perechi baze din secvența 16S rADN, tulpina Ps33 prezintă o asemănare de 99,92% cu tulpina *Serratia plymuthica* G3, izolată din rizosfera de grâu, număr de acces EU344964, respectiv, 99,84% cu tulpina *Serratia plymuthica* AY394724, înalt producătoare de biofilme (Van Houdt et al, 2005, *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 246:265-272). Secvența 16S rADN a tulpinii Ps33 a fost depusă la NCBI, GenBank, cu numărul EU1181134.

Tabelul 3

Secvența 16 S rADN pentru tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica*

Tulpina	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	
Ps33	GGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGG	21
	AGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGA	
	CCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGG	23
	GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT	
	GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTC	25
	CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG	
	CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCA	27
	GCGAGGAGGAAGGGTAATGTGTTAATAGCACATTGCATTGACGTTACTCGC	
	AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG	29
	GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTT	
	GTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAA	31
	CTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT	
	GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG	33
	GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	
	ATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCT	35
	TGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTA	
	CGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG	37
	TGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTG	
	ACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGA	39
	CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGT	
	CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCCGGGA	41
ACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC		
AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA	43	
TACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTC		
GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA	45	
GTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG		

# RO 127469 B1

1 Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii Ps33 a fost efectuată pe mediul cu  
2 cartof dextroză agar (CGA). Tulpina Ps33 (dintr-o cultură de 24 h) a fost însămânțată pe  
3 mediu prin strierea cu ansa a unei linii drepte o distanță de 3 cm de o rondea calibrată de  
4 miceliu (5 mm) din cele opt ciuperci studiate. Plăcile Petri astfel însămânțate au fost incubate  
5 la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 24, 48 și 72 h. Experiența  
6 a fost repetată de trei ori. Rezultatele (tabelul 4) au demonstrat că tulpina Ps33 produce  
7 metaboliți antifungici, care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai  
8 mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciupercile producătoare de mucegaiuri *Botrytis*  
9 *cinerea* (7 mm), *Sclerotinia sclerotiorum* (6 mm) și *Sclerotinia bataticola* (5 mm). Acțiunea  
10 biologică este semnificativă și față de *R. solani* (4 mm), *Verticillium dahliae* (4 mm), *F.*  
11 *oxisporum* f. sp. *radicis lycopersici* (3,5 mm). Bacteria prezintă un antagonism moderat și față  
12 de *Fusarium graminearum* (2,5 mm) și *Alternaria* spp (1,5 mm).

Tabelul 4

15 Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Serratia plymuthica* Ps33 asupra  
16 creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm)\*

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusă de tulpina Ps33
<i>Rhizoctonia solani</i>	4
<i>AltQrmaria</i> spp.	1,5
<i>Fusarium graminearum</i>	2,5
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	3,5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	6
<i>Sclerotium bataticola</i>	5
<i>Botrytis cinerea</i>	7
<i>Verticillium dahliae</i>	4

27 \*media a 5 determinări

29 Tulpina Ps33 a fost testată în condiții controlate, în ceea ce privește eficacitatea în  
30 combaterea ciupercilor fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium*  
31 *oxisporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*), care atacă frecvent în stadiul  
32 de plantulă și produc pagube. Pentru efectuarea testului, s-au utilizat semințe de tomate  
33 (*Lycopersicon esculentum*), cv. Unirea. Semințele dezinfectate în prealabil cu soluție 4%  
34 hipoclorit, au fost imersate într-un amestec constând din suspensie celulară bacteriană cu  
35 titrul de  $1 \times 10^9$  ufc/ ml și 1% metilceluloză în tampon fosfat (w/v). Ciupercile fitopatogene au  
36 fost crescute pe mediul CGA (Difco), în scopul obținerii unei creșteri uniforme a miceliului.  
37 După incubare 4...5 zile, la 28°C, miceliul a fost mărunțit și utilizat pentru inocularea a 200 ml  
38 mediu Czapek-Dox (CDA, Difco), distribuit în flacoane Erlenmeyer. Flacoanele însămânțate  
39 au fost incubate timp de 4-5 zile la 28°C. Sporii au fost separați de miceliu prin filtrare,  
40 utilizând o pânză sterilă. Semințele de tomate bacterizate au fost semănate în pungă din  
41 material plastic sterile (cyg - Mega International) și plasate în camera de creștere, în condiții  
42 de temperatură și umiditate corespunzătoare (21...23°C, 70% umiditate relativă). Fiecare  
43 pungă a fost umezită cu 2 ml soluție nutritivă Hoagland, infectată cu spori în concentrație  
44 de  $10^6$  spori/litru soluție. În variantele martor netratat, pentru umezire, s-a utilizat doar  
45 soluție nutritivă Hoagland. Semințele din varianta martor chimic au fost tratate cu Tiradin  
46 70 PU (doză echivalentă a 4 g/kg). Pungile au fost reumectate la fiecare două zile, pe  
47 parcursul a patru săptămâni, folosindu-se pentru reumectare soluții nutritive sterile.

# RO 127469 B1

După patru săptămâni, plantele au fost analizate în privința simptomelor caracteristice fiecărei boli, cu precădere brunificarea coletului și a părții superioare a rădăcinilor. Eficacitatea tratamentului cu tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* în combaterea bolilor complexului de răsărire la tomate este prezentată în tabelul 5.

Tabelul 5

Eficacitatea tulpinii Ps33 în combaterea bolilor complexului de răsărire la cultura de tomate (cv. Unirea)

Varianta de tratament	% Plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% Plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% Plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)
Inocul fungic	R.F.R*		S. s.*		S.b.*	
Martor netratat	45	-	50	-	53	
Tiradin 70 PU (4 g/kg)	93	87	98	96	90	79
Ps33	95	89	98	96	88	74

R.F.P. - *Rhizoctonia solani*- *Fusarium oxysporum*- *Pythium ultimum*; S. s.-*Sclerotinia sclerotiorum*; S. b.-*Sclerotium bataticola*.

Tratamentul semințelor cu tulpina Ps33 a determinat obținerea unei eficacități mai mari (89%) în varianta infectată cu complexul ciupercilor fitopatogene de sol R.F.P. decât cea obținută în varianta tratată cu Tiradin (87%). Tulpina testată prezintă o semnificativă acțiune de protecție a plantelor de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol.

S-a demonstrat că bacteriile Ps33 prezintă antagonism *in vitro* și *in situ* și față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas ice*<sup>+</sup>).

Testul *in vitro* s-a efectuat pe mediul LB agarizat. Tulpinile fitopatogene folosite au fost *E. amylovora* NCAIM B 01108 și *Pseudomonas syhngae* ATCC 53543. Tulpinile, împrăștiate cu 24 h înainte de efectuarea testului, au fost însămânțate simultan în plăci Petri cu mediu LB agarizat, tulpinile fitopatogene fiind striate pe mijlocul plăcii, iar tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* perpendicular, la o distanță de 2 mm. Plăcile au fost incubate la 28°C, timp de 24...48 h. Testul a fost repetat de cinci ori. Rezultatul pozitiv s-a apreciat prin apariția zonelor de inhibiție. Tulpina Pss 33 a inhibat *in vitro* creșterea fitopatogenilor care afectează pomii fructiferi la înflorit (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae ice*<sup>+</sup>).

Testul *in situ* s-a realizat prin determinarea interacțiilor microbiene pe flori detașate. Modelul experimental utilizat a fost cel al florilor izolate (Pusey, 1997). Ramuri de măr cu muguri au fost tăiate din copaci, cu 4...5 zile înainte de înflorit și depuse la 4°C, cu baza imersată în apă. La startul experimentelor, ramurile au fost scoase de la frigider și menținute la temperatura camerei (20...23°C). Mugurii florali s-au deschis în două zile. Conform protocolului, florile deschise (petalele și antele roșii) au fost prelevate cu pedunculul intact (1,5 cm lungime) și plasate în tuburi de microcentrifugă, cu capătul bazal al pedunculului scufundat într-o soluție sterilă de 20% zaharoză. Peste florile astfel pregătite, au fost pulverizate suspensii 10<sup>6</sup> ufc/ml din tulpinile antagoniste testate. Suspensiile au fost preparate în tampon fosfat 10 mM cu 0,03% Tween 20. Tuburile Eppendorf au fost depuse în rack-uri, iar rack-urile cu flori inoculate au fost transferate în cutii din plastic de 10 l, pe al căror fund era depozitată o soluție de glicerină 40% (pentru menținerea unei umidități de 93...94%). Concomitent cu tratamentul cu bacterii antagoniste (în funcție de varianta testată), peste florile detașate, s-a adăugat o suspensie 10<sup>6</sup> ufc bacterii fitopatogene (*Erwinia amylovora*

# RO 127469 B1

1 NCAIM B 01108 și *Pseudomonas syringae* ATCC 53543). S-a incubat la 20°C (*Erwinia amylovora*) sau la 0°C (bacteriile care nuclează gheață). După 24 h, s-au făcut notări de  
 3 eficacitate, conform unei scări de eficacitate, cu note de la 0 la 5, conform următoarei scări:  
 5 0 - distrugere totală a florilor; 1 - 80...90% dintre flori distruse; 2 - 60...80% dintre flori distruse;  
 2 - 40...60% dintre flori distruse; 3 - 20...40% dintre flori distruse; 5 - 0...20% dintre flori  
 distruse.

7 Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6, comparativ pentru *Serratia plymuthica* Ps33  
 cu alte tulpini din colecția de lucru. Aceste rezultate demonstrează o foarte bună eficacitate  
 9 *in situ* a tulpinii Ps33 în combaterea bacteriilor care afectează pomii fructiferi la înflorit.

Tabelul 6

## Acțiunea biologică *in situ* față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit

Codificare	Tulpina	Eficacitate <i>in situ</i> față de <i>E. amylovora</i> <sup>a</sup>	Eficacitate <i>in situ</i> față de <i>P. syringae</i> ices <sup>b</sup>
P10	<i>Pseudomonas</i> sp. (posibil <i>P. aeruginosa</i> )	3	2
P11	<i>Pseudomonas</i> sp.	2	2
P14	<i>Pseudomonas</i> sp. (posibil <i>P. aeruginosa</i> )	1	3
P18	<i>Pseudomonas</i> sp.	2	4
P20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	1
P22	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	4	3
P23	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	4	1
Bw	<i>Bacillus</i> sp.	2	3
BCPC	<i>Bacillus</i> sp.	3	4
B40	<i>B. licheniformis</i>	4	1
B2R	<i>B. subtilis</i>	4	2
B005	<i>B. subtilis</i>	3	2
B30	<i>B. subtilis</i>	4	5
Loblb	<i>B. subtilis</i>	2	1
Sal1	<i>B. subtilis</i>	3	3
R3P5M	<i>Bacillus</i> sp.	3	2
R6P4G	<i>Bacillus</i> sp.	2	1
R9P7M	<i>Bacillus</i> sp.	1	2
R11P5M	<i>Bacillus</i> sp.	0	2
R3P5P	<i>Bacillus</i> sp.	1	2
Ps33	<i>Serratia plymuthica</i>	5	4

37 a, b) notări de la 0 la 5, conform următoarei scări: 0 - distrugere totală a florilor; 1 - 80... 90% dintre flori distruse;  
 2- 60 ... 80% dintre flori distruse; 3 - 40, . 60% dintre flori distruse; 4 - 20...40% dintre flori distruse; 5 - 0...20%  
 39 dintre flori distruse.

41 Rezultatele prezentate mai sus demonstrează o activitate superioară în cadrul  
 43 testelor *in vivo* și *in situ* față de testele *in vitro*. Această caracteristică este explicată de  
 45 capacitatea ridicată a bacteriilor din genul *Serratia* de a forma biofilme pe organele subterane  
 ale plantelor (Liu et al, 2007, *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 299...305). Capacitatea de a forma  
 47 biofilme este dependentă de sensibilitatea de grup, mediată de semnalele AHL (Van Houdt  
 et al., 2007, *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 407-424). S-au realizat diferite teste, pentru a se  
 determina producerea de semnale QS (AHL) de către bacteriile *Serratia plymuthica* Ps33 și  
 producerea de biofilme pe diferite suprafețe.



## RO 127469 B1

Pentru evidențierea moleculelor implicate în sensibilitatea de grup (quorum sensing), s-au folosit două tulpini biosenzor, *Chromobacterium violaceum* CV026 și *A. tumefaciens* NT1. 1 3

Tulpina mutantă CV026 a fost obținută din tulpina sălbatică *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 și este folosită ca biosenzor pentru detectarea moleculelor de tip AHL. *Chromobacterium violaceum* CV026 produce pigmenți de culoare violetă, numiți violesceină, doar atunci când în mediu sunt prezente molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei de acil între C<sub>4</sub> și C<sub>8</sub>. 5 7

*Agrobacterium tumefaciens* NT1 este o bacterie mutantă, obținută din tulpina sălbatică, prin fuzionarea genei Tra cu gena LacZ. Astfel gena LacZ nu mai poate sintetiza molecule de AHL și astfel nu poate fi activată enzima B-galactozidază. Prin urmare, X-galul prezentă în mediu nu poate fi descompusă de către *Agrobacterium tumefaciens* NT1, și astfel mediul nu se decolorează. Dacă AHL este prezent în mediu (de exemplu, fiind sintetizată de alte bacterii), atunci apare o culoare albastru-verzui. Tulpina biosenzor de *A. tumefaciens* NT1 produce pigmenți de culoare verzuie-albăstrui, doar atunci când în mediu sunt detectate molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei de acil între C<sub>4</sub> și C<sub>12</sub>. 9 11 13 15 17

Tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* și tulpinile biosenzor CV026 și NT1 au fost împrăștiate pe mediul agarizat Luria-Bertani (10 g bacto-triptonă, 5 g extract de drojdii, 10 g NaCl, 20 g agar-agar, pH 7,2, sterilizat 20 min, la 121°C), cu 24 h înainte de utilizare. În cazul tulpinilor biosenzor, mediul LB s-a suplimentat cu cloramfenicol (concentrație finală de 5 μg/ml) sau kanamicină (concentrație finală de 50 μg/ml). 19 21

Testul propriu-zis a constatat în trasarea unui striu, în centrul unei plăci Petri, cu tulpina biosenzor CV026 sau NT1, apoi, perpendicular pe aceasta, s-a striat tulpina Ps33, la o distanță de 3 mm față de tulpina martor. Plăcile s-au incubat la 28°C și au fost analizate la 24 h. Apariția culorii violet în zona de creștere a tulpinii Cv026, respectiv, a culorii verzi în zona de creștere a tulpinii NT1, a indicat prezența moleculelor de acil-homoserin-lactonă, produse de tulpina Ps33. Testul a fost repetat de trei ori, cu ambele tulpini biosenzor. De fiecare dată, s-a evidențiat apariția culorii specifice diferitelor tulpini biosenzor, fapt care demonstrează producerea de către tulpina Ps33 de molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei acil între C<sub>4</sub> și C<sub>12</sub>. 23 25 27 29 31

Capacitatea de formare de biofilme *in vitro* a fost analizată prin metoda spectrofotometrică. Bacteriile Ps33 au fost crescute pe mediul lichid LB, la 28°C, până la atingerea unei densități optice OD<sub>595</sub>=2.0. Aceste culturi s-au transferat apoi aseptice pe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri, cu opt repetiții din fiecare tip de tulpină testată. 33 35

Plăcile s-au incubat la 25°C, pentru 24 h. Turbiditatea celulelor se determină folosind un reader de plăci de microtitrare. După perioada de incubare de 24 h, mediul lichid s-a spălat de trei ori cu apă sterilă, pentru a se îndepărta bacteriile slab asociate. Plăcile s-au uscat la temperatura camerei, timp de 45 min, după care s-a colorat fiecare godeu cu o soluție de 0,1% de verde de malachit, timp de 20 min. S-a spălat colorantul de trei ori cu apă sterilă și s-a observat biofilmul colorat în verde. Analiza cantitativă s-a realizat prin spălarea colorantului cu etanol și cuantificarea prezenței verdelui de malachit cu reader de plăci de microtitrare la 630 nm (verdele de malachit având absorbantă maximă la 620 nm). Rezultatele obținute pentru diferite tulpini testate sunt prezentate în tabelul 7, comparativ pentru tulpina Ps33 și pentru alte izolate testate. Se remarcă faptul că tulpina Ps33 produce o cantitate semnificativă de biofilm *in vitro*. 37 39 41 43 45

Valorile absorbantei colorantului verde de malachit, eliberat din biofilmele formate pe pereții godeurilor din placa de microtitrare

Nr.	Martor	I12	I16	I15	KG16	Ps33	Ps23	Ps43	B60	B92	B34	B52
1	0,05	0,17	0,09	0,23	0,13	0,48	0,16	0,32	0,33	0,12	0,45	0,37
2	0,04	0,12	0,07	0,18	0,08	0,54	0,05	0,35	0,32	0,15	0,42	0,39
3	0,07	0,1	0,13	0,21	0,09	0,56	0,11	0,22	0,3	0,13	0,27	0,38
4	0,05	0,12	0,09	0,11	0,1	0,52	0,07	0,31	0,29	0,13	0,42	0,4
5	0,08	0,09	0,1	0,14	0,09	0,47	0,12	0,29	0,26	0,12	0,37	0,33
6	0,06	0,05	0,07	0,18	0,07	0,55	0,07	0,21	0,33	0,1	0,25	0,26
7	0,07	0,13	0,1	0,15	0,09	0,54	0,12	0,2	0,31	0,12	0,34	0,33
8	0,08	0,2	1,12	0,25	0,1	0,58	0,19	0,33	0,29	0,22	0,39	0,33
medie	0,06	0,12	0,22	0,18	0,09	0,53	0,11	0,28	0,30	0,14	0,36	0,35

Pentru testarea producerii *in situ* de biofilme, s-a lucrat pe varianta determinării biofilmului format pe nisip. Într-o placă cu 24 godeuri, s-au adăugat 0,5 ml de nisip steril (granulație fină, 0,2...0,4 mm). Peste acest nisip, s-au adus 0,5 ml suspensie bacteriană, preparată ca mai jos. Bacteriile Ps33 s-au crescut pe mediul LB, până la atingerea unei  $D_{0,600} = 2,0$ . S-a spălat și s-a resuspendat în același mediu. S-a incubat la 28°C. După 48 h, s-au prelevat aseptice 0,1 ml de amestec nisip - mediu de cultură, s-au adus într-un tub de centrifugă steril, cu masă cunoscută, s-a centrifugat și s-a îndepărtat aseptice supernatantul. S-a cântărit nisipul depus centrifugal în fiecare dintre cele 24 tuburi de centrifugă. S-au adăugat apoi 0,15 ml soluție 10 mM  $MgSO_4$  în toate tuburile și s-a vortexat. Din supernatantul în care s-au reluat bacteriile, s-a determinat numărul de ufc, prin tehnica diluțiilor.

Tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* a fost comparată din punct de vedere al capacității de formare biofilme cu tulpina HRO-C48 (= DSMZ 12502), tulpină recunoscută pentru capacitatea de protecție a rizosferei plantelor prin formare de biofilme (Liu et al, 2007, *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 299...305). Din tulpina Ps33, s-au recuperat  $7,5 \cdot 10^8 \pm 1,1 \cdot 10^7$  ufc  $g^{-1}$  de nisip, comparativ cu  $2,8 \cdot 10^8 \pm 5,2 \cdot 10^7$  ufc, pentru tulpina HRO-C48.

Pentru testarea capacității de formare de biofilme *in situ* pe organele plantei, s-a lucrat cu testul reizolării de pe rădăcinuțele plantulelor de grâu. Bacteriile au fost cultivate peste noapte, pe mediul lichid LB. S-a normalizat suspensia la  $2 \cdot 10^8$  ufc/ml cu mediu LB steril, iar din această suspensie, s-au depus 10  $\mu$ l pe rădăcinuțele unor plante de grâu gnotobiotice (provenite din substanțe de grâu dezinfectate la suprafață, germinate timp de 5 zile, în condiții aseptice). Depunerea s-a realizat pe colet, la marginea dintre rădăcinuță și cotiledon. S-a incubat timp de 24 h, după care rădăcinuța a fost detașată steril din plantulă și depusă aseptice într-un tub de centrifugă. Peste rădăcinuța, s-au adăugat 0,15 ml soluție 10 mM  $MgSO_4$  și s-a vortexat pentru 5 min. Supernatantul s-a reluat prin sucțiune, iar rădăcinuța a fost extrasă din tubul de centrifugă și fost uscată prin depunere aseptice pe hârtie de filtru sterilă. Rădăcinuța uscată a fost depusă aseptice pe mediul semisolid CM-agaroză (10 g/l casaminoacizi, 10 g/l manitol, 3 g/l agaroză), suplimentat cu 10 ml soluție sterilă nutritivă. Soluția sterilă nutritivă a fost obținută prin diluarea de 100 ori a unei soluții stoc (H metal) și sterilizarea prin filtrare. Pentru obținerea a 200 ml de soluție stoc H metal, s-a procedat după cum urmează. S-au obținut 100 ml soluție de lucru prin diluare de 500 ori a unei soluții stoc care conținea: 1,5 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , dizolvată mai întâi, 50 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 100 mg  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 100 mg  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 50 mg  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 50 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  și 20 mg  $H_3BO_3$ . La cei 100 ml din această soluție, s-au adăugat 50 mg  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  și 50 mg acid ascorbic.

## RO 127469 B1

Din rădăcinuțe, s-au obținut colonii dendritice, al căror aspect specific demonstrează existența unor caracteristici de mobilitate asociate formării de biofilme pe organele subterane ale plantelor de cultură. 1  
3

Tulpina Ps33 a fost testată în ceea ce privește mobilitatea de migrare la suprafața agarului (swimming) și de agregare (swarming). Ca martor, a fost utilizată o tulpină modificată genetic pentru a fi imobilă, *P. putida* PCL1760 (Validov, 2007). Bacteria a fost îmborsătată pe mediul LB suplimentat cu 1,8% agar și crescută peste noapte la 28°C. Vase Petri cu 25 ml de mediu LB suplimentat cu 0,3% agar, pentru swimming și cu 0,5% agar pentru swarming, au fost preparate și lăsate să se usuce pentru 20...30 min, în hota cu flux laminar, înainte de utilizare. Tulpina de analizat a fost inoculată, prin înțepare, în centrul mediului, cu betișoare sterile din lemn. După 18 h de incubare la 28°C, plăcile au fost analizate în ceea ce privește mobilitatea. Rezultatele au reflectat, în cazul tulpinii Ps33, prezența ambelor tipuri de mobilitate. Mobilitatea are un rol major în colonizarea rădăcinilor plantelor și este factorul direct implicat în mecanismul de combatere biologică prin competiție, pentru nutrienți și spațiu. 5  
7  
9  
11  
13  
15

Producerea de compuși volatili cu rol în fitostimulare a fost demonstrată prin determinarea producerii de acetoină. Acetoina (3-hidroxi-2-butanona, HB) este un metabolit fiziologic important, excretat de microorganisme atunci când sunt crescute într-un mediu de cultură conținând glucoză sau alte surse de carbon degradabile pe calea Embden - Meyerhof. Formarea acetoinii este pusă în evidență prin reacția Voges-Proskauer și servește drept marker în clasificarea microbială, având un rol important în reglarea ratei NAD/NADH și în stocarea carbonului. Producerea de acetoină demonstrează și capacitatea respectivelor tulpini de a produce 2,3-butandiol, compus volatil, cu rol în stimularea creșterii plantelor, tulpina Ps33 a fost crescută 24 h în LB (incubată la 28°C, cu agitare), apoi 100 μl de cultură au fost inoculați în 5 ml mediu lichid cu glucoză (proteoză - peptonă - 7 g, glucoză - 5 g, NaCl - 5 g, apă distilată - 1000 ml), distribuit în eprubete, sterilizat 15 min, la 1 atm. Cultura a fost preparată în trei repetiții și testată pentru producerea de acetoină la 3, 5 și 7 zile după inoculare, și incubare la 28°C. Ca reactiv, s-a utilizat o soluție 10% NaOH, câte 1 ml distribuit în fiecare eprubetă și, ulterior, adăugarea, în fiecare eprubetă, a 1 mg de creatină, mixtura fiind agitată viguros. Apariția culorii roșii, după 30...60 min, la temperatura camerei, a indicat prezența acetyl-metil-carbinolului, deci o reacție pozitivă. 17  
19  
21  
23  
25  
27  
29  
31

Într-o altă serie de experimente, s-a testat capacitatea bacteriilor Ps33 de a solubiliza fosforul din compușii săi insolubili. Pentru determinarea capacității de solubilizare a fosforului mineral, s-a utilizat mediul agarizat Pikovskaya, care conține (per litru): 0,5 g extract drojdie, 10 g glucoză, 5 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,0001 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,0001 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O și 15 g agar. Pe acest mediu, bacteriile tulpinii Ps33 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat fosforul mineral. Capacitatea de a solubiliza fosforul organic s-a testat pe mediul PSM (phytate screening medium), care conține (per litru): 10 g glucoză, 4 g fitat de sodiu, 2 g CaCl<sub>2</sub>, 5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 15 g agar. Și pe acest mediu, bacteriile tulpinii Ps33 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat și fosforul organic din fitați. 33  
35  
37  
39  
41

Activitatea de stimulare a creșterii plantelor a tulpinii Ps33 a fost pusă în evidență prin efectuarea de experimente în condiții controlate, folosind plantule de grâu, *Triticum aestivum*, cv. Alex. În vederea inoculării, cariopsele de grâu au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfectie a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 sec, cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă. 43  
45  
47

# RO 127469 B1

Cea de-a doua dezinfectie s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4 %, timp de 15 min. Ulterior, au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 în 25 min, timp de două ore. Cariopsele astfel dezinfectate au fost păstrate la 4°C, la întuneric, pe hârtie de filtru umectată. Tulpina Ps33 a fost cultivată pe mediul LB lichid la 28°C și 150 rpm, timp de 16 h. Inocularea semințelor s-a realizat la două concentrații, de 10<sup>6</sup> sau de 10<sup>8</sup> ufc/ml. Bacterizarea cariopselor a fost efectuată prin imersare în suspensie bacteriană timp de 15 min, la temperatura camerei și agitare la 20 rpm. Ca martor, au fost folosite cariopse de grâu, sterilizate ca mai sus și imersate în apă distilată sterilă.

Cariopsele de grâu, inoculate conform metodei descrise mai sus, au fost puse la germinat în plăci Petri (cu diametrul de 9,4 cm), pe apă agarizată 0,8%, în număr de 20 de cariopse/placă, în cinci repetiții. Fiecare variantă a constat în 100 de cariopse. Temperatura de incubare a fost de 28°C. S-au făcut observații în ceea ce privește numărul semințelor germinate la 24, 48 și 72 h.

Pentru determinarea influenței bacteriilor Ps33 asupra dezvoltării plantulelor de grâu, cariopsele de grâu inoculate cu suspensie bacteriană în concentrație de 10<sup>6</sup> sau 10<sup>8</sup> ufc/ml au fost distribuite în vase Petri (cu apă agarizată, diametrul plăcilor de 9,4 cm), câte 10 semințe/placă, în trei repetiții (30 cariopse per variantă). Peste apa agarizată, au fost adăugați câte 5 ml de mediu mineral nutritiv pentru plante, cu formula: 0,4 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,4 g KNO<sub>3</sub>, 1,6 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,8 g MgSO<sub>4</sub>, agarizat cu 2 g la litru. Plăcile au fost incubate la întuneric, la 28°C. S-au efectuat observații în ceea ce privește efectul de stimulare a creșterii rădăcinuțelor și a plantulelor de grâu după 72 h, determinându-se lungimea rădăcinuței și înălțimea plantulei.

Determinările referitoare la influența tulpinii asupra germinării și a dezvoltării plantulelor au fost realizate comparativ față de un martor reprezentat de apă distilată sterilă, și față de tulpini de bacili cu activitate fitostimulatorie dovedită. Rezultatele prezentate în tabelele 8 și 9 susțin existența unui efect fitostimulator, exercitat de bacteriile Ps33 asupra plantulelor de grâu și, în special, asupra sistemului radicular.

Tabelul 8

*Influența inoculului bacterian asupra capacității de germinare a cariopselor de grâu (cv. Alex)*

Tulpină bacteriană	Încadrare taxonomică	Concentrație inocul (ufc/ml)	% de cariopse germinate după		
			24 h	48 h	72 h
Mt	Apă distilată sterilă	-	75	88	92
B49b	<i>Bacillus subtilis</i>	10 <sup>6</sup>	79	89	98
FL400	<i>Paenibacillus graminis</i>	10 <sup>6</sup>	71	88	88
Ps 33	<i>Serratia plymuthica</i>	10 <sup>6</sup>	84	89	98

Tabelul 9

*Testarea efectului de stimulare a creșterii plantelor de grâu (cv. Alex) de către tulpinile de bacterii testate (72 h postinoculare)*

Tulpină bacteriană	Concentrație inocul ufc/ml)	Germinație		Nr. răd. (cm.)	Lungime răd. (cm)	Înălțime plantulă (cm)
		Din 30 semințe	%			
B49b	10 <sup>6</sup>	24	80	4	3,79	2,02
B49b	10 <sup>8</sup>	29	96,7	4	3,05	1,89
FL400	10 <sup>8</sup>	26	86	3	3,93	2,27

Tabelul 9 (continuare)

Tulpină bacteriană	Concentrație inocul ufc/ml)	Germinație		Nr. răd. (cm.)	Lungime răd. (cm)	Înălțime plantulă (cm)
		Din 30 semințe	%			
Ps 33	10 <sup>6</sup>	29	96,7	4	4,05	2,52
Ps 33	10 <sup>8</sup>	29	96,7	4	3,87	2,43
Mt	-	25	83,3	4	3,68	2,54

DL 5%

0,38

0,27

Pentru a se determina influența tulpinii Ps33 asupra biodisponibilității seleniului pentru plantele de grâu și de porumb, au fost realizate experimente de seră și de câmp. În cadrul experimentelor de seră, s-a lucrat cu substrat de creștere (prelivosol roșcat: mraniță: nisip - 2:1:1, repartizat în vase de vegetație cu suprafața de 0,050 m<sup>2</sup> și cu un volum de 15 l), la care s-au aplicat tratamente ale solului la locul de însămânțare ("în brazdă") în raport de 1 ml per vas de vegetație (corespunzând la 200 l/ha).

Boabele de porumb (PR36D79 Pioneer) și de grâu (cv. Boema) au fost dezinfectate prin menținere 5 min în hipoclorit 5% și spălări repetate cu apă distilată. Boabele astfel dezinfectate au fost plasate în vasele de vegetație (2 boabe de porumb într-un singur cuib, 20 boabe de grâu uniform distribuite). La locul de însămânțare a fiecărui bob, s-au aplicat tratamente cu soluția de aplicare, 1 ml pentru cele două boabe de porumb, câte 50 μl pentru fiecare bob de grâu. Soluția de aplicare conținea 10<sup>7</sup> sau 10<sup>8</sup> ufc tulpină Ps33, 3,0 g/l zaharoză, 0,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l NaCl, 7 g/l plasmolizat de drojdie suplimentat cu 100±5 mg Se/100 plasmolizat 0,5 g/l glutamat de sodiu și 0,2 g/l K<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. Bacteriile au fost introduse, ca suspensie concentrată, în soluția obținută prin dizolvarea, pe rând, a fiecărui ingredient în apă dură standard (considerată în literatura de specialitate ca fiind un etalon pentru apa de fântână).

Apa dură standard s-a obținut prin amestecarea a 68,5 ml soluție A cu 17 ml soluție B, într-un Berzelius de 1000 ml. S-a diluat apoi cu circa 800 ml apă distilată și s-a adus pH-ul la 6...7, prin adăugare de NaOH 0,1 N. S-a transferat într-un vas cotelat de 1000 ml și s-a adus la semn cu apă distilată.

Soluția A s-a preparat astfel: s-au cântărit 4 g carbonat de calciu și s-au transferat într-un flacon conic de 50 ml, cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat încet 82 ml HCl 1 N, agitând conținutul. Când tot carbonatul de calciu s-a dizolvat, s-a diluat soluția la circa 400 ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO<sub>2</sub>. S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu soluție de amoniac 1 N până la culoarea intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotelat de 1000 ml.

Soluția B s-a preparat astfel: s-au cântărit exact 1,613 g oxid de magneziu și s-au transferat într-un flacon de 500 ml cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat 82 ml HCl 1 N. S-a reîncălzit încet până la dizolvare, s-a diluat la circa 400 ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO<sub>2</sub>. S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu o soluție de amoniac 1 N, până la o culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotelat de 1000 ml, s-a adus la semn cu apă distilată și s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon din polietilenă.

Variantele experimentale care au fost realizate sunt:

V<sub>1</sub> - martor netratat cu (semințe/sol);

V<sub>2</sub> - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat;

# RO 127469 B1

- 1  $V_3$  - sol tratat "în brazdă" cu *Serratia plymuthica* Ps33  $10^7$ , în soluția de aplicare;  
 2  $V_4$  - sol tratat "în brazdă" cu *Serratia plymuthica* Ps33  $10^8$ , în soluția de aplicare;  
 3  $V_5$  - martor tratament foliar ziua a 14-a de la răsărire (5 ml soluție 0,1 mg% Se sub  
 formă de selenat de sodiu, echivalent a 10 g/ha seleniu).

5 Din experimentele realizate, s-au recoltat circa 2...3 g de material vegetal, atunci  
 când grâul a ajuns la faza de înfrățire, respectiv, când porumbul a ajuns în faza de 8 frunze  
 7 complete. Materialul vegetal s-a cântărit cu o precizie de 1 mg și s-a adus într-un balon cu  
 dop rodat de 250 cm<sup>3</sup>. S-au adăugat 20 cm<sup>3</sup> de acid azotic concentrat și s-a lăsat două zile  
 9 la temperatura camerei. După aceea, s-au adăugat 2 cm<sup>3</sup> acid percloric concentrat, iar la  
 balon, s-a atașat un refrigerent cu spirală. S-a pus pe baie de nisip cu temperatura de 180°C,  
 11 la nișă chimică și s-a fiert timp de 16 h. S-a demontat refrigerentul, s-au adăugat 1 cm<sup>3</sup> de  
 acid sulfuric concentrat, după care s-a continuat evaporarea sub nișă, circa trei ore, până la  
 13 un volum de 1...2 cm<sup>3</sup>. Soluția s-a răcit, s-a adăugat 1 cm<sup>3</sup> de acid azotic concentrat și s-a  
 ținut pe baia de apă, timp de 10 min. Mineralizatul astfel obținut s-a transvazat cantitativ într-  
 un pahar Berzelius de 100 cm<sup>3</sup>. La proba astfel dezagregată, s-au adăugat 5 cm<sup>3</sup> soluție de  
 15 mascare, după care pH-ul soluției s-a adus la 2, cu soluție de hidroxid de amoniu. S-au  
 17 adăugat 5 cm<sup>3</sup> de soluție 0,1% 2,3-diamino-naftalină, după care s-a lăsat în întuneric, două  
 ore. După formarea complexului, soluția s-a transvazat cantitativ într-o pâlnie de separare.  
 19 Complexul piaszelenolic format a fost extras repetat cu ciclohexan 2x5 cm<sup>3</sup>, agitând intens  
 două minute. Fazele organice s-au reunit și s-a determinat fluorescența la o lumină de  
 21 excitare de 380 nm și la o emisie de 519 nm. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul  
 10. Acestea demonstrează că tulpina Ps33 este o tulpină care are o capacitate ridicată de  
 23 a biodisponibiliza seleniul, pentru plantele de grâu și de porumb.

Tabelul 10

Nivelurile de seleniu total ( $\mu\text{g/kg}$ ) în țesuturile plantelor provenite din semințe  
 tratate "în brazdă" cu o soluție seleniată și tulpină Ps33

Varianta experimentală	Grâu	Porumb
$V_1$ - martor netratat (semințe/sol);	44,3±5,2 <sup>c</sup>	46,3±4,5 <sup>c</sup>
$V_2$ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat	54,6±4,6 <sup>b</sup>	56,7±3,7 <sup>b</sup>
$V_3$ - sol tratat "în brazdă" cu <i>Serratia plymuthica</i> Ps33 $10^7$ în soluția de aplicare	62,2±4,8 <sup>ab</sup>	64,6±6,3 <sup>ab</sup>
$V_4$ - sol tratat "în brazdă" cu <i>Serratia plymuthica</i> Ps33 $10^8$ în soluția de aplicare	71,6±4,4 <sup>a</sup>	72,5±4,3 <sup>a</sup>
$V_5$ - martor tratament foliar ziua a 14	68,8±7,1 <sup>a</sup>	71,2±5,6 <sup>a</sup>

39 Tulpina Ps33 a fost testată și în cadrul unui experiment de câmp, amplasat în  
 Dobrogea, pe suprafețe mari. Bacteriile au fost aplicate în brazdă concomitent cu semănatul,  
 41 prin utilizarea de echipamente agricole specifice de aplicare soluției în brazdă, la presiuni de  
 lucru cuprinse între 0,5 și 3 bari ale echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și  
 43 la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h. Soluția de aplicare a  
 inclus aceleași componente, care însă au fost dizolvate în apă de fântână. Experimentul a  
 45 fost realizat în pătrat latin, cu patru variante în patru repetiții. Cele patru variante au fost:

- 47  $V_1$  - martor netratat cu (semințe/sol);  
 48  $V_2$  - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat;  
 49  $V_3$  - sol tratat "în brazdă" cu *Serratia plymuthica* Ps33,  $10^8$  în soluția de aplicare;

# RO 127469 B1

V<sub>4</sub> - martor tratament foliar ziua, la faza de spic în burduf (500 litri soluție 2 mg % Se, sub formă de selenat de sodiu, echivalent a 10 g/ha seleniu). 1

Din experiment, au fost prelevate probe în fenofaza de formare a boabelor și la recoltare, probe de boabe. În aceste probe, s-a determinat nivelul de seleniu total, prin digestia umedă a probelor de sol cu un amestec de acizi azotic, sulfuric, percloric pentru transformarea tuturor speciilor moleculare Se în seleniat (SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), reducerea acestuia cu NaBH<sub>4</sub> la H<sub>2</sub>Se și dozarea lui prin HG-AAS (generare de hidruură cu dozarea seleniului prin spectroscopie de absorbție atomică în flacără). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 11. 3  
5  
7

9

Tabelul 11

Influența tratamentului de inoculare în brazdă cu tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* asupra preluării și acumulării de seleniu (μg/kg) 11

Varianta experimentală	Material vegetal	Grâu boabe
V <sub>1</sub> - martor netratat (semințe/sol);	39,5±5,2 <sup>c</sup>	106,3±4,5 <sup>c</sup>
V <sub>2</sub> - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat	53,6±4,6 <sup>bc</sup>	116,7±5,7 <sup>b</sup>
V <sub>3</sub> - sol tratat "în brazdă" cu <i>Serratia plymuthica</i> Ps33 10 <sup>8</sup> în soluția de aplicare	77,6±4,4 <sup>a</sup>	136,5±7,3 <sup>a</sup>
V <sub>4</sub> - martor tratament foliar ziua a 14	62,8±7,1 <sup>b</sup>	121, ±7,9 <sup>b</sup>

Tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* stimulează acumularea și preluarea seleniului de către plantele de grâu în condiții de câmp și poate fi utilizată pentru ameliorarea proceselor de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu. 21  
23

Testarea inocuității tulpinilor bacteriene s-a realizat prin utilizarea larvelor de insecte de *Galleria mellonella*. Larvele au fost crescute pe substrat de cultură, la 30°C, substratul având următoarea compoziție: mălai 400 g, făină 200 g, tărâțe de grâu 200 g. Toate aceste componente s-au ținut în congelator, timp de 7...10 zile, după care s-au sterilizat prin menținere la 70°C, timp de două ore. La aceste componente sterilizate, s-au adăugat drojdie uscată măcinată 100 g și lapte praf 200 g. La acest amestec pulverulent, s-au adăugat 700 ml de amestec lichid, compus din 350 ml miere și 350 ml glicerină, în care s-a dizolvat ceară de albine (1:1). Compoziția finală s-a omogenizat la mixer și s-a păstrat în cutie de plastic, la 4°C. 25  
27  
29  
31

Larvele de vârstă a treia au fost păstrate la 4°C pe substratul menționat mai sus. Pentru infectare, s-a folosit o seringă Hamilton de 5 μl. S-au injectat câte 5 μl de suspensie bacteriană prin partea stângă a ultimului segment. După injectare, larvele au fost plasate în incubator, la întuneric, la 30°C, temperatura optimă pentru creșterea și dezvoltarea acestora. 33  
35

A fost realizată o serie de 10 diluții seriale, combinând concentrații bacteriene între 10<sup>6</sup> și 0, în soluție 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 1,2 mg/ml ampicilină, cu care s-au injectat larvele de *Galleria melonella*. Concentrația inoculului start a corespuns unei densități optice (DO 600 nm) de 1,435. Larvele martor au fost injectate cu câte 5 μl soluție 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 1,2 mg/ml ampicilină, pentru a evalua orice potențial efect letal al procesului de injectare. Din fiecare diluție, s-au injectat câte 10 larve, fiind efectuate câte trei repetiții/diluție. Monitorizarea larvelor (moarte, vie) s-a făcut la 48...72 h după infecție, la 30°C (tabelul 12). 37  
39  
41  
43

Mortalitatea larvelor de *Galleria mellonella*, injectate cu suspensii  $10^6$  ufc/ml din tulpina de testat

Varianta	Repetiția	24 h postinfecție		48 h postinfecție		72 h postinfecție		
		vii	moarte	vii	moarte	vii	moarte	crisalide
Martor 10 mM MgSO <sub>4</sub> + 1.2 mg/ml ampicilină (DO 0,000)	R1	10	0	10	0	10	0	2
	R2	10	0	10	0	9	1	1
	R3	10	0	10	0	9	1	-
Ps33 $10^6$ ufc/ml	R1	10	0	9	1	8	2	-
	R2	8	2	8	2	8	2	-
	R3	10	0	10	0	9	1	1

Datele din tabelul 12 demonstrează faptul că tulpina testată, Ps33, nu prezintă practic patogenitate față de larvele de *Galleria mellonella*, neavând capacitatea de a se multiplica în corpul larvelor și de a produce bacteremii, deși au fost injectate în limfa larvelor. Aceste tulpini au o activitate biologică ridicată (antagonism, stimulare a creșterii plantelor, capacitate de biodisponibilizare a seleniului) și nu prezintă caracteristici de patogenitate pentru organisme nețintă. În concluzie, această tulpină are potențial de utilizare în practică, atât pentru protecția plantelor împotriva atacului fitopatogeni, cât și pentru biofortifierea recoltei de grâu cu seleniu.



# RO 127469 B1

## Revendicare

1

Tulpină de *Serratia plymuthica*, Ps33, înregistrată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, cu numărul NCAIM (P) B001366, **caracterizată prin aceea că** are acțiune de protecție *in vivo* a plantelor de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol *Rhizoctonia solani*, *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia bataticola*, *Verticillium dahliae*, și acțiunii antagoniste față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit, *Erwinia amylovora*, pseudomonasuri ice<sup>+</sup>, prezintă mobilitate ridicată și formează biofilme, colonizând suprafețele organelor plantelor și rezistând la factorii adverși de mediu, stimulează dezvoltarea plantelor de grâu, datorită producerii de compuși volatili și solubilizării fosforului, biodisponibilizează seleniul pentru plantele de grâu și de porumb, și favorizează acumularea seleniului în boabele de grâu.

13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 88/2015