



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00145**

(22) Data de depozit: **16.02.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2013** BOPI nr. **4/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2010 BOPI nr. **8/2010**

(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.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
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;*
• **SICUIA OANA,** *STR.VICINA NR.3, BL.33,
SC.3, AP.154, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;*
• **GYONGYVER MARA,** *PIAȚA LIBERTĂȚII
NR.10, SC.C, AP.35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;*
• **BEATA ABRAHAM,** *STR.CULMEI NR.11,
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;*
• **LANYI SZABOLCS,** *STR.MIKO NR.21,
MIERCUREA CIUC, HR, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2007/0068072 A1; US 7022644 B2

(54) **PROCEDEU DE TRATARE A SOLULUI CU
MICROORGANISME BIO/AGROINOCULANTE**



RO 125670 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de tratare a solului cu microorganisme folositoare
2 plantelor de cultură, care sunt destinate colonizării microbiocenozelor delimitate de organele
3 subterane ale plantelor, și sunt generic denumite microorganisme bio/agroinoculante.

4 Sunt cunoscute diverse procedee de cultivare și aplicare a microorganismelor
5 bio/agroinoculante, microorganisme cu acțiuni multiple asupra plantelor de cultură (furnizare
6 de azot fixat biologic, solubilizare fosfor, biodisponibilizare microelemente; protecție împotriva
7 agenților de dăunare; stimularea creșterii plantelor ca urmare a producerii de fitohormoni și
8 precursori în rizoplanul plantelor de cultură etc.) și solului. La câțiva ani după descoperirea
9 simbiozei dintre rizobi și leguminoase doi cercetători germani (Nobbe și Hiltner) au obținut
10 brevete în Marea Britanie (**GB 189511460**) și SUA (**US 570813**) pentru primul procedeu
11 aplicare a bacteriilor fixatoare de azot în simbioză cu leguminoasele. Aceste brevete se referă
12 la cultivarea unei tulpini de bacterii (specifice pentru o plantă leguminoasă dată) pe un mediu
13 semisintetic (zahăr, asparagină, extract apos din părți verzi de leguminoase), gelificat cu agar-
14 gelatină și repartizat pe peretele inferior al unui flacon de sticlă. Cultura de microorganisme
15 rezultată pe acest mediu gelificat își păstra viabilitatea timp de câteva luni. Flacoanele din sticlă
16 erau transportate la locul aplicării, bacteriile fixatoare de azot fiind reluate într-o soluție apoasă
17 (care includea zahăr, asparagină și extract apos din părți verzi de leguminoase), în proporție
18 de 1...3 l soluție per flacon. Suspensia astfel rezultată (denumită emulsie de cultură pură în
19 brevetele inițiale) era utilizată pentru tratamentul prin umectare al seminței de leguminoase,
20 prin amestecare viguroasă, împreună cu un mediu destinat stimulării dezvoltării bacteriilor
21 inoculate (respectiv, soluția de zahăr, asparagină și extract apos din părțile verzi de
22 leguminoase, eventual inclusă de la început în lichidul destinat reluării culturii de pe mediu
23 gelificat) și apoi și cu un material granular uscat (sol, nisip sau materiale similare), destinat
24 prevenirii aglomerării materialului semincer. Revendicarea acestor brevete este pentru pro-
25 cedeele de tratare a seminței de leguminoase.

26 Acest procedeu inițial de aplicare a inoculanților agricoli prezintă însă o serie de
27 dezavantaje: i. prețul de cost ridicat datorită prețului mare al agarului; ii. termenul de
28 valabilitate relativ scăzut care impunea o activitate sezonieră de producție; iii. volumul mare
29 și greutatea ridicată a flacoanelor din sticlă utilizată pentru cultivarea bacteriilor; iv. slaba
30 reproductibilitate în practică a extractului apos din părți verzi de plante leguminoase, utilizat
31 în mediile de cultură gelificate și în cele de stimulare a dezvoltării bacteriilor inoculante; v.
32 lipsa de selectivitate a sursei de carbon; vi. aplicarea în două etape a tratamentului, cu o
33 etapă umedă și una uscată consumatoare de timp și de manoperă; vii. reducerea semnifi-
34 cativă a numărului de microorganisme pe semințe, ca urmare a aderenței scăzute a
35 microorganismelor pe sămânță și/sau a supraviețuirii reduse în cazul însămânțării în sol cu
36 umiditate scăzută ca urmare a lipsei de rezistență la desicare.

37 Pentru înlăturarea dezavantajelor procedeeului inițial, au fost dezvoltate noi procedee
38 de cultivare și aplicare. Cultivarea în masă a microorganismelor s-a realizat pe medii lichide,
39 aerate și agitate, care au fost considerate mai productive și mai ieftine. S-a eliminat astfel
40 utilizarea agarului ca agent de gelificare. În mediul de cultură, extractul apos din părți verzi de
41 plante leguminoase a fost înlocuit cu extract de drojdie, produs mai ușor de obținut și
42 standardizat. Zahărul a fost înlocuit cu polioli derivați din zaharide (ca de exemplu manitolul),
43 pentru a crește selectivitatea sursei de carbon din mediul de cultură. Suspensia de micro-
44 organisme în mediul de cultură a fost adsorbită în suporturi de condiționare (de o mare varie-
45 tate), repartizate în ambalaje din materiale plastice. S-au eliminat astfel flacoanele din sticlă
46 și a crescut rata de supraviețuire a microorganismelor inoculante. Utilizarea unor suporturi
47 de condiționare solide a permis eliminarea etapei de aplicare a materialului granular uscat
(destinat prevenirii aglomerării materialului semincer umectat cu suspensie de inoculanți).

RO 125670 B1

Pentru creșterea aderenței pe sămânță în momentul tratamentului, s-au folosit diferiți adezivi, care fie au fost introduși în suportul de condiționare, fie erau aplicați ca tratament umed concomitent cu inoculanții. Pentru creșterea ratei de supraviețuire a microorganismelor inoculante pe sămânță, au fost folosiți polimeri biodegradabili hidrofilii (de exemplu, derivați de celuloză) și/sau osmoprotectanți (ca, de exemplu, trehaloza).	1 3 5
Toate aceste perfecționări ale procedurii inițial de cultivare și aplicare a microorganismelor inoculante au fost prezentate în brevete (unele deja ajunse în domeniul public) și lucrări științifice, care au fost însumate în manuale și ghiduri de bună practică. Un exemplu este cel al ghidului de bună practică în producerea și aplicarea inoculanților, care a fost publicat de Organizația pentru Alimentație și Agricultură (<i>Guidelines for inoculant production</i> , FAO, Roma, 1994).	7 9 11
Procedeele de aplicare, dezvoltate inițial pentru bacteriile fixatoare de azot în simbioză cu leguminoasele, au fost extinse și pentru alte microorganisme utile plantelor de cultură - bacterii fixatoare de azot asociative și/sau libere în sol, microorganisme care solubilizează fosforul anorganic din sol, rizobacterii favorizante ale creșterii plantelor (PGPR - plant growth promoting rhizobacteria), microorganisme entomopatogene și/sau antagoniste pentru fitopatogeni etc.	13 15 17
Deși foarte larg utilizate și, în prezent, bioprodusele inoculante, condiționate pe suporturi solide, prezintă și o serie de dezavantaje legate de condițiile de aplicare (care solicită manoperă suplimentară pentru descărcarea sacilor cu sămânță, umectarea semințelor cu soluții de adezivi, tratarea semințelor cu biopreparat pe suport solid, reînsăcuire, transport la câmp), de aspirarea de pe sămânță, în cazul anumitor tipuri de semănători și de compatibilitatea redusă a inoculanților pe suporturi solide, aplicați ca tratament la sămânță, cu produsele de protecția plantelor, aplicate sub aceeași formă de tratament.	19 21 23
Pentru înlăturarea dezavantajelor de mai sus, au fost propuse mai multe soluții. Pentru creșterea ratei de supraviețuire la desicare și a compatibilității cu produsele de protecția plantelor, au fost descrise procedee prin care se produc bioproduse inoculante cu eliberare controlată, destinate, în general, tratamentului solului. Aceste procedee au avantajul și de a permite elaborarea unor bioproduse a căror aplicare asigură o colonizare continuă a rizosferei și a rizoplanului de către microorganismele inoculante, eliberate treptat din matricea de condiționare.	25 27 29 31
Unele procedee implică închiderea microorganismelor în geluri din polimeri biodegradabili, urmată de uscarea (micro)granulelor rezultate.	33
Brevetul US 4818530 descrie un procedeu de realizare a granulelor de alginat de calciu, care conțin spori de ciuperci antagoniste pentru fitopatogeni. Acest procedeu implică amestecarea sporilor de ciuperci antagoniste cu o soluție coloidală de alginat de sodiu, coacervarea picăturilor de amestec alginat, spori într-o soluție de clorură de calciu, urmată de recoltarea și uscarea granulelor. Procedeele are dezavantajul de a utiliza spori de ciuperci recoltate de pe un mediu agarizat, prețul de cost al agarului împiedicând ridicarea la scară. Acest procedeu, care a fost aplicat prin închidere în gel de alginat de calciu, a fost extins pentru bacteriile inoculante, cultivate pe medii lichide aerate și agitate (Bashan, <i>Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth</i> , <i>Appl Environ Microbiol.</i> , 51, 1089-1098, 1986).	35 37 39 41 43
Alte procedee de realizare a bioproduselor agroinoculante cu eliberare controlată, destinate tratării solului, utilizează purtători solizi, minerali, cu o structură foarte poroasă.	45
FR 2899580 descrie includerea unor forme L de <i>Rhizobium</i> (rezultate prin tratarea cu lizozim a suspensiilor de bacterii obținute după cultivarea 24...48 h pe medii lichide) în zeoliți naturali și utilizarea compoziției astfel rezultate.	47

RO 125670 B1

1 Documentul **WO 2004/005219 A1** prezintă un procedeu prin care se amestecă o
suspensie de rizobii, turbă, apă și argile (bentonită sau saponită, în proporție de 50...98%),
3 care apoi se granulează și se usucă, pentru a se obține o compoziție cu eliberare controlată.

Procedeele care implică bioproduse cu eliberare controlată, aplicate la sol, au
5 dezavantajul că vehiculează cantități importante de bioproduse și materiale accesorii, care
trebuie transportate la locul de aplicare.

7 Alte căi de rezolvare a problemelor tehnice, asociate dezavantajelor prezentate, de
aplicare a bioproduselor/biopreparatelor inoculante, condiționate pe suporturi solide, au fost
9 cele care folosesc polimeri hidrofilii. Polimerii superadsorbantți au fost folosiți pentru
condiționarea/traparea microorganismelor inoculante. Poliacrilamida a fost printre primii
11 polimeri propuși ca alternativă la suporturile solide (Domergues și Hoang, *Polyacrylamide
entrapped Rhizobium as inoculant for legumes, Appl. Environ. Microbiology* 37, 779-781,
13 1979). În lucrarea citată, autorii au demonstrat că aplicarea rizobilor cultivați pe medii lichide
și condiționați prin închidere în gel de poliacrilamidă au aceeași eficacitate ca și cele
15 adsorbite în turbă neagră. Producerea poliacrilamidei implică însă utilizarea unor monomeri
neurotoxici și a unui personal înalt calificat, fapt care a limitat extinderea acestei soluții de
17 condiționare.

În brevetul **US 4975105**, este descris un procedeu de aplicare a microorganismelor
19 inoculante din categoria ciupercilor de exomicoriză (*Suillus luteus*, *Pisolithus tinctorius*), în
care respectivele microorganisme inoculante sunt incluse într-un polimer superadsorbant
21 (poliacrilat și săruri de policarilat; copolimeri de poliacrilați cu poliacrilamidă și/sau alcool
polivinilic), care este gonflat în apă la de 300...500 ori greutatea inițială, și în care sunt apoi
23 introduse rădăcinile plantelor tratate. Acest procedeu este limitat numai la tratamentul
arborilor și al arbuștilor aflați în curs de transplantare la locul definitiv.

25 S-au realizat și procedee de aplicare a inoculanților pe medii lichide cu viscozitate
ridicată.

27 Brevetul **US 6606822 B2** descrie o compoziție de inoculant lichid, rezultată prin
amestecarea, în proporție de 1:1, a suspensiei de microorganisme rezultate după cultivare
29 timp 7 zile în mediul de cultură lichid, cu o soluție conținând 3% polivinilpirolidonă și 0,2%
K₂MoO₄, care asigură o bună supraviețuire a rizobilor, atât în suportul de condiționare, cât
31 și pe semințele tratate.

În brevetul **US 7022644 B2**, compoziția lichidă pentru păstrarea pe timp îndelungat
33 a rizobilor inoculanți este realizată prin adăugarea peste suspensia de microorganisme
rezultată după cultivare, timp de 96 h, în mediul de cultură lichid a maltozei (solidă și sirop)
35 și a sorbatului de potasiu.

US 2007/00 68072 A1 protejează un procedeu în care bacteriile inoculante (fixatoare
37 de azot sau favorizante ale creșterii plantelor) sunt cultivate pe mediu lichid, aerat și agitat,
recoltate aseptice și apoi trecute pe un mediu (semi)lichid care conține un amestec de derivați
39 de celuloză - polimeri solubili și surse de carbon constând în aminoacizi, amidon, manitol,
dextrine, maltodextrine, singure sau în amestec. Compoziția astfel rezultată este apoi
41 aplicată ca tratament al seminței și/sau solului.

Cu foarte puține excepții, toate procedeele dezvoltate până acum prezintă
43 dezavantajul de a implica o etapă de cultivare în masă a microorganismelor inoculante, pe
medii lichide aerate și agitate. Pentru a corespunde cerințelor acestei etape, au fost
45 eliminate, din producția de inoculanți agricoli, tulpinile cu creștere mai lentă și producere
masivă de exopolizaharid, adică tocmai tulpinile pe care studiile efectuate le-au dovedit a fi
47 cu eficacitate și competitivitate ridicată (Leigh și Coplin, *Exopolysaccharides in Plant-
Bacterial Interactions, Annu. Rev. Microbiol.*, 46:307-46, 1992).

RO 125670 B1

În cazul în care se folosesc medii gelificate pentru multiplicarea microorganismelor inoculante, gelifierea se realizează cu agar, prețul de cost al acestui material obținut prin recoltare din natură împiedicând extinderea pe scară largă a unor astfel de soluții tehnice.	1 3
Un alt dezavantaj al procedeelelor descrise mai sus este specificitatea ridicată a acestora, respectiv, dezvoltarea lor preponderent pentru un anumit tip de microorganism inoculant. Corolarul acestui tip de specificitate ridicată este lipsa unor procedee de aplicare care să ofere condiții favorabile pentru dezvoltarea unor consorții microbiene de consens prin cocultivarea diferitelor tulpini compatibile de microorganisme inoculante și apoi aplicarea acestora printr-un tratament unic.	5 7 9
Un alt dezavantaj al procedeelelor dezvoltate până în prezent este compatibilitatea redusă a aplicării bio/agroinoculanților cu tratamentele cu pesticide chimice, destinate protecției plantelor împotriva agenților de dăunare din sol.	11
Problemă tehnică, pe care o rezolvă invenția, este de a realiza un procedeu de aplicare a microorganismelor inoculante, prin care să se micșoreze cantitatea de produs care este transportat la locul de aplicare, să se reducă mortalitatea microorganismelor bio/agroinoculante ca urmare a desicării consecutive aplicării și/sau toxicității pentru rizobi a pesticidelor aplicate concomitent, ca tratament al seminței și să se mărească rata de succes a inoculării, inclusiv prin utilizarea unor consorții microbiene bio/agroinoculante de consens.	13 15 17 19
Procedeul conform invenției constă în: realizarea unui volum de 10...20 l de soluție de aplicare prin dizolvarea în apă proaspătă de fântână, încălzită la temperatura mediului ambiant, a cantităților de substanțe corespunzătoare următoarelor concentrații: 3,0 g/l zaharoză; 0,5 g/l K_2HPO_4 ; 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/l NaCl; 0,1 g/l extract de drojdie; 0,5 g/l glutamat de sodiu; 0,2 g/l K_2MoO_4 ; distribuirea a 200...250 ml de mediu de cultură hidrogelificat, împreună cu microorganisme inoculante, crescute pe acest mediu, în soluția de aplicare, în raport de 200...250 ml, la 2...5 l de soluție de aplicare; amestecarea mediului cu cultură hidrogelificat pe care au crescut microorganisme cu soluția de aplicat, timp de 10...15 min; decantarea supernatantului și înlăturarea resturilor de hidrogel; diluarea suspensiei de microorganisme în soluție de aplicare cu apă proaspătă de fântână, până la realizarea unor norme de aplicare cuprinse între 91 și 218 l/ha și aplicarea suspensiei rezultate în brazdă concomitent cu semănatul, prin utilizarea de echipamente agricole specifice, la presiuni de lucru cuprinse între 0,5 și 3 bari, a echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.	21 23 25 27 29 31 33
Procedeul conform invenției are următoarele avantaje:	
- aplicarea ca suspensie apoasă și folosirea ca agent de diluare a apei de fântână, material larg accesibil, fapt care reduce semnificativ cantitatea de produs condiționat, necesară a fi transportată la locul de aplicare;	35 37
- lipsa de influență asupra inoculării a produsele de protecția plantelor, aplicate ca tratament al seminței, întrucât aplicarea microorganismelor inoculante se face pe brazdă;	39
- favorizarea acțiunii microorganismelor inoculante atât asupra solului, cât și asupra plantei de cultură, datorită aplicării pe brazdă în momentul semănatului;	41
- posibilitatea utilizării de consorții microbiene de consens, datorită folosirii mediilor de cultură hidrogelificate care permit cocultivarea diferitelor tulpini compatibile de microorganisme inoculante;	43
- utilizarea pentru orice tip de microorganism (bio/agro)inoculant, de la bacterii fixatoare de azot în simbioză cu leguminoasele, la ciuperci antagoniste.	45
Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple.	47

RO 125670 B1

1 **Exemplul 1.** Se prepară 1 l de mediu Lazareva, cu următoarea compoziție: manitol
10 g/l; K_2HPO_4 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/l; NaCl 0,2 g/l; $CaSO_4$ 0,1 g/l; $MnSO_4$ 0,005 g/l;
3 $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,002 g/l; extract de drojdii 1 g/l. Ingredientele mediului de cultură se
dizolvă, pe rând, în circa 800 ml apă distilată, se aduce la 1000 ml cu apă distilată, se verifică
5 și se corectează, dacă este nevoie, la pH 6,8. Se adaugă, la 1000 ml mediu de cultură lichid
Lazareva, 5 g de hidrogel - polimer hidrofil superadsorbant (Aquasorb, copolimer poli-acrilat -
7 poliacrilamidă, destinat pentru reținerea apei în sol și substraturi de creștere, produs de SNF
Floerger, Franța), se așteaptă 15 min, pentru gonflarea hidrogelului - polimerului
9 superadsorbant și apoi se scurge excesul de mediu de cultură. Se distribuie 200 ml mediu
de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant gonflat într-o pungă de polipropilenă cu
11 volum de 400 ml și se sigilează punga prin termosudare. Pungile de polipropilenă cu mediu
de cultură adsorbit în hidrogeluri superadsorbante se sterilizează la 121°C, timp de 20 min.
13 Se inoculează fiecare pungă, prin injectarea aseptică cu 2 ml de suspensie 10^6 ufc/ml,
tulpina SO_{600} de *Bradyrhizobium japonicum* (număr de depunere NCAIM 001354). Se
15 resigilează punga în condiții aseptice și se incubează timp de 7 zile, la temperatura de 28°C.
După 7 zile de incubare, se scot pungile cu hidrogel din incubator, se reambalează în pungi
17 de polietilenă de dimensiuni mai mari, se etichetează și se depozitează în locuri ferite de
umiditate, lumină și căldură excesivă.

19 Aplicarea microorganismelor s-a realizat în condiții controlate (seră), pentru a se testa
procedul de aplicare și a se verifica păstrarea calităților biologice ale tulpinii de
21 *Bradyrhizobium japonicum*, după cultivare pe medii hidrogelifiate. S-au realizat 2 l de soluție
(de aplicare), cu următoarea compoziție: 3,0 g/l zaharoză; 0,5 g/l K_2HPO_4 ; 0,2 g/l
23 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/l NaCl; 0,1 g/l extract de drojdie; 0,5 g/l glutamat de sodiu, 0,2 g/l
 K_2MoO_4 . Ingredientele au fost dizolvate, pe rând, în apă dură standard (considerată în
25 literatura de specialitate ca fiind un etalon pentru apa de fântână).

27 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 cotate de 1000 ml și s-a adus
29 la semn cu apă distilată.

31 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
33 soluția la circa 400 ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția și
apoi s-au adăugat două picături de soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu soluție de
35 amoniac 1 N până la o culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon
cotate de 1000 ml, s-a adus la semn cu apă distilată și apoi s-a transvazat pentru păstrare
37 într-un flacon de polietilenă.

39 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
41 distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături
de soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu o soluție de amoniac 1 N, până la culoare
43 intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotate de 1000 ml, s-a adus la
semn cu apă distilată și s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon de polietilenă.

45 S-a desfăcut ambalajul de depozitare și transport din polietilenă, s-a tăiat ambalajul
din polipropilenă cu hidrogel pe care au crescut microorganismele inoculante și au fost
47 distribuiți cei 200 ml de mediu de cultură hidrogelifiat, împreună cu microorganismele
inoculante, crescute pe acest mediu, în soluția de aplicat, în raport de 200 ml la 2 l de soluție

RO 125670 B1

de aplicare. S-a amestecat mediul cu cultură hidrogelifiat pe care au crescut microorganisme cu soluția de aplicat, timp de 15 min, s-a decantat supernatantul și s-au înlăturat resturile de hidrogel. Suspensia de microorganisme în soluție de aplicare s-a diluat în raport 1 la 10, cu apă dură standard, iar soluția diluată a fost aplicată ca tratament al substratului de creștere (preluposol roșcat: mraniță: nisip - 2:1:1, repartizat în ghivece cu suprafața de 0,025 m² și cu un volum de 7,5 l), în raport de 0,5 ml per ghiveci (corespunzând la 200 l/ha). În fiecare ghiveci, au fost însămânțate câte 4 bobbe de soia (*Glycine max*, cv. *Danubian*), fiecare la câte 10 cm una de alta. Pentru fiecare bob însămânțat, s-au aplicat 0,125 ml de suspensie bacteriană inoculantă, preparată ca mai sus.

Exemplul 2. Procedeu descris în cazul exemplului 1 se repetă pentru tulpina Td50 de *Trichoderma viride* (număr de depozit NCAIM001358), cu următoarele diferențe: se folosește mediul Weindling, cu următoarea compoziție: glucoză 25 g/l; bactopectonă 2 g/l; KH₂PO₄ 1 g/l; MgSO₄ 1 g/l; FeCl₃ 0,1 g/l; pH 6,4. Se distribuie 250 ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 500 ml. Se incubează timp de 7 zile, la temperatura de 25°C. La aplicare, cei 250 ml de mediu de cultură hidrogelifiat pe care au crescut ciupercile antagoniste au fost diluați cu 2,5 l de soluție de aplicare, care au fost apoi diluați 1 la 10, din suspensia finală, inoculându-se solul. Pentru testarea procedurii de aplicare și verificarea păstrării activității biologice după cultivare pe hidrogel, s-au folosit semințe de castraveți (*Cucumis sativus*, cv. *Joker*), fiecare sămânță fiind amplasată la câte 10 cm una de alta.

Exemplul 3. Procedeu descris în cazul exemplului 1 se repetă pentru un consorțiu format din *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Mz269 (număr de depozitare NCAIM B 001351) și *Paenibacillus graminis* FL400 (număr de depozitare NCAIM B 001361), cu următoarele diferențe: se folosește tot mediu *Lazareva*, dar se distribuie 250 ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 500 ml. Se incubează timp de 3 zile la temperatura de 29°C. La aplicare, cei 250 ml de mediu de cultură hidrogelifiat pe care a crescut consorțiul bacterian politulpinal au fost diluați cu 5 l de soluție de aplicare, care au fost apoi diluați 1 la 4, din suspensia finală, inoculându-se solul. Pentru testarea procedurii de aplicare și verificarea păstrării activității biologice, după cultivare pe hidrogel, s-au folosit semințe de mazăre (*Pisum sativum* cv. *Dora*), fiecare bob fiind amplasat la câte 10 cm unul de altul.

Plantele rezultate din semințele însămânțate în sol tratat cu microorganisme bio/agroinoculante au fost crescute în condiții controlate (temperatură de 22±1°C, iluminare 12 h pe zi, cu 250 μmol fotoni m⁻²s⁻¹, umețare substrat de creștere la 80% capacitate de reținere a apei). După 30 de zile de cultivare, s-au recoltat nodulii plantelor de soia și mazăre (în care s-a estimat activitatea nitrogenazică prin determinare activității acetilenreductazice), iar în plantele de castraveți provenite din semințe însămânțate în sol inoculat cu ciuperci antagoniste *Trichoderma viride* Td50, s-a determinat activitatea polifenoloxidazei, enzimă marker pentru inducerea la nivel sistemic a rezistenței dobândite (SAR).

Pentru aplicarea practică cu echipamente de pulverizat pneumatice specifice (aplicator pe brazdă de produse lichide), normele de lichid sunt cuprinse între 91 și 218 l/ha, pentru presiuni de lucru ale echipamentului de pulverizat cuprinse între 0,5 și 3 bari, la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.

Cantitatea de lichid aplicată pe brazdă, pe fiecare metru liniar:

- pentru norma minimă de 91 l/ha: 0,004 l pe fiecare duză;
- pentru norma maximă de 218 l/ha: 0,010 l pe fiecare duză.

RO 125670 B1

1 Cantitatea de lichid aplicată per sămânță:

(Observații: pentru acest calcul, s-a luat în considerare o normă mare de suspensie de
3 microorganisme inoculante, respectiv, de 200 l/ha; calculul se poate face pentru orice normă
realizată de echipament, între 91 și 218 l/ha).

5 - pentru soia (norma de însămânțare medie este de 90 kg/ha): 200 l/ha : 90 kg/ha = 2,22 l/kg;
- pentru fasole (norma de însămânțare medie este de 140 kg/ha): 200 l/ha : 140 kg/ha
7 = 1,43 l/kg;

9 - pentru mazăre (norma de însămânțare medie este de 250 kg/ha): 200 l/ha : 250 kg/ha
= 0,8 l/kg;

11 - pentru năut (norma de însămânțare medie este de 110 kg/ha): 200 l/ha : 110 kg/ha
= 1,81 l/kg.

13 În cazul experimentelor de aplicare realizate în condiții controlate, s-a urmărit
influența procedurii de aplicare (cu doze corespunzătoare celor de 200 de l/ha) asupra
15 unor caracteristici biologice (activitatea acetilenreductazică, inducerea proteinelor asociate
cu rezistența indusă sistemic), aflate în directă legătură cu acțiunea microorganismelor
17 inoculante. În fiecare caz, s-a lucrat cu variante martor în care tulpinile de microorganisme
inoculante au fost cultivate pe mediile corespunzătoare, prezentate în exemplele 1-3,
19 agarizate, iar reluarea de pe respectivele medii și aplicarea s-a realizat cu tampon fosfat
steril.

21 Tabel

23 *Influența cultivării pe medii hidrogelificate asupra păstrării caracteristicilor biologice ale
tulpinilor de microorganisme inoculante*

25 Variantă experimentală	Activitate nitrogenazică (μmoli C ₂ H ₄ /g noduli 27 proaspeți)	Activitatea polifenoloxidazei (U [*] /mg substanță proaspătă)
29 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SO ₆₀₀ , cultivat pe mediu Lazareva agarizat	10,2±1,4	-
Conform exemplului 1	12,6±1,7	-
31 <i>Trichoderma viride</i> Td50, cultivat pe mediu Weindling agarizat	-	2,7±0,24
33 Conform exemplului 2	-	3,1±0,37
35 <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Mz269 și <i>Paenibacillus graminis</i> FL400, cultivat pe mediu Lazareva agarizat	12,8±2,2	-
37 Conform exemplului 3	15,2±2,8	-

39 *O unitate enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă ce determină absorbanta la 420 nm în mediul de reacție
(0,6 ml soluție de catechol 0,01 M în tampon fosfat de potasiu 0,01 M, pH 6,2) cu 0,01/min.

41 Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai sus. Aceste rezultate demon-
strează păstrarea caracteristicilor tulpinilor inoculante după aplicare conform procedurii
43 descris în această invenție.

Procedeu de tratare a solului cu microorganisme bio/agroinoculante, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: realizarea unui volum de 10...20 l de soluție de aplicare, prin dizolvarea în apă proaspătă de fântână, încălzită la temperatura mediului ambiant, a cantităților de substanțe corespunzătoare următoarelor concentrații: 3,0 g/l zaharoză; 0,5 g/l K_2HPO_4 ; 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/l NaCl; 0,1 g/l extract de drojdie; 0,5 g/l glutamat de sodiu; 0,2 g/l K_2MoO_4 ; distribuirea a 200...250 ml de mediu de cultură hidrogelifiat, împreună cu microorganisme inoculante, crescute pe acest mediu, în soluția de aplicare, în raport de 200...250 ml, la 2...5 l de soluție de aplicare; amestecarea mediului cu cultură hidrogelifiat pe care au crescut microorgansime cu soluția de aplicat, timp de 10...15 min; decantarea supernatantului și înlăturarea resturilor de hidrogel; diluarea suspensiei de microorganisme în soluție de aplicare cu apă proaspătă de fântână, până la realizarea unor norme de aplicare cuprinse între 91 și 218 l/ha, și aplicarea suspensiei rezultate în brazdă, concomitent cu semănatul, prin utilizarea de echipamente agricole specifice, la presiuni de lucru cuprinse între 0,5 și 3 bari a echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.	3 5 7 9 11 13 15 17
--	--

