



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00422**

(22) Data de depozit: **12.06.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.05.2014 BOPI nr. **5/2014**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA SAPIENȚIA,**
STR.MATEI CORVIN NR.4, CLUJ NAPOCA,
CJ, RO

(72) Inventatori:
• **TAMAS EVA,** *STR. CARPAȚI NR. 34A,*
GHEORGHENI, HR, RO;
• **MARA GYONGYVER,** *PIAȚA LIBERTĂȚII*
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• **MATHE ISTVAN,**
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;

• **GYORGY EVA,** *STR.TOPLIȚA NR.50,*
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **ABRAHAM BEATA,** *STR. CULMEI BL.11,*
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **LASLO EVA,** *BD. FRĂȚIEI NR. 2, SC. E,*
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **LANYI SZABOLCS,** *STR.MIKO NR.21,*
MIERCUREA CIUC, HR, RO

(74) Mandatar:
HARCOV A.P.I. S.R.L.,
STR. NICOLAE IORGA NR.61, BL. 10E,
SC. B, AP.9, SFÂNTU GHEORGHE,
JUDEȚUL COVASNA

(54) **BIOPREPARAT MICROBIAN CU EFECT BIOFERTILIZANT ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biopreparat microbial, utilizat ca biofertilizant în agricultură, și la un procedeu de obținere a acestuia. Biopreparatul conform invenției este compus din tulpina *Delftia lacustris* 6BS, depusă la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, din Budapesta, cu număr de depozit NCAIM (P) B001396, și tulpina *Pseudomonas sp. 12BS*, depusă la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, din Budapesta, cu număr de depozit NCAIM (P) B001397, având capacitatea de a promova creșterea plantelor prin mobilizarea elementelor nutritive din surse organice. Procedeu conform

invenției cuprinde obținerea unui inocul prin cultivarea tulpinii *Delftia lacustris* 6BS și *Pseudomonas sp. 12BS* pe medii care conțin zaharoza, ca sursă de carbon, făina de azot, ca sursă de azot, și săruri minerale, la o temperatură de 28°C, timp de 24 h, cu agitare și, respectiv, amestecarea celor două biomase obținute, în raport gravimetric de 1:1, care se poate aplica pe sămânță sau plantulă sau sol.

Revendicări: 4
Figuri: 4



1

Problema pe care o rezolva inventia este de a realiza un nou preparat bacterian compus din tulpina *Delftia lacustris* 6BS si tulpina *Pseudomonas* sp.12BS pentru biofertilizarea plantelor de cultura.

Cele doua tulpini *Delftia lacustris* 6BS si tulpina *Pseudomonas* sp.12BS conform inventiei sunt depuse la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numerele de depozit NCAIM (P) B001396 și NCAIM (P) B001397.

Procedeul de obtinere a unor biopreparate cu rol de biofertilizare cu ajutorul tulpinilor bacteriene *Delftia lacustris* 6BS si tulpina *Pseudomonas* sp. 12BS izolate din sol din Depresiunea Ciucului si rezervația naturală Mlaștina Borsáros conform inventiei, consta in aceea ca, cuprinde obtinerea unui inocul, prin cultivarea tulpinii *Delftia lacustris* 6BS si *Pseudomonas* sp. 12BS pe medii care contin zaharoza ca sursa de carbon, făină de soia ca surse de azot si K_2HPO_4 la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare, amestecarea celor doua biomase obtinute in raport gravimetric de 1:1, care se aplica pe samanta sau plantula sau sol.

Prin realizarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

- prin aceasta invenție se dă o propunere pentru o noua formula de biopreparat microbial cu efect bisfertilizant
- tulpinile bacteriene care stau la baza biopreparatului biofertilizant sunt tulpini bacteriene autohtone
- realizarea acestei consortii bacteriene prin izolarea a două tulpini bacteriene si determinarea caracterelor de mobilizare a elementelor nutritive
- un nou produs folosibil in agricultura durabilă care îmbunătățește calitățile nutritive ale plantelor
- bacteriile sunt ușor cultivabile, se multiplică rapid
- procedeul de realizare a biopreparatului microbial cu efect biofertilizant este simplu și poate fi ușor ridicat la scară de industrie

Tulpinile bacteriene *Delftia lacustris* 6BS si *Pseudomonas* sp.12BS folosite in procesul biotehologic sunt izolate din sol din Depresiunea Ciucului, rezervația naturală Mlaștina Borsáros si caracterizate genetic prin identificare.

Biopreparatul microbial cu efect de biofertilizare s-a obtinut cu un amestec de tulpini microbiene și anume tulpina bacteriana *Delftia lacustris* 6BS si *Pseudomonas* sp.12BS originată din sol din Depresiunea Ciucului, rezervația naturală Mlaștina Borsáros.

Biopreparatul microbial conform inventiei consta in a realiza un nou preparat bacterian compus tulpinii *Delftia lacustris* 6BS si *Pseudomonas* sp.12BS pe medii care contin zaharoza ca sursa de carbon, făina de soia ca sursa de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare, amestecarea celor doua biomase obtinute in raport gravimetric de 1:1, care se poate aplica pe samanta sau plantula sau sol.

Pentru mediile de cultivare, s-au folosit ca surse de carbon: zaharoză, ca surse de azot: făina de soia. În afara de aceste materii prime, s-au folosit și sare minerală care conține potasiu și fosfor.

Efectul biopreparatului microbial obținut s-a studiat *in vitro* și la plantele de grâu, cu rezultate bune în ceea ce privește caracterele benefice și promovarea creșterii a plantelor de grâu.

Procedeul de obținere prin biosinteza a biopreparatelor microbial conform invenției constă în următoarele.

- În prima fază se obține cultura de preinocul prin cultivarea în flacoane cu agitare a tulpinilor de bacterii *Delftia lacustris* 6BS și *Pseudomonas* sp. 12BS pe medii specifice. Acestea conțin ca surse de carbon: zaharoza, ca surse de azot: făina de soia și săruri minerale.
- Dezvoltarea tulpinilor de microorganisme are loc la temperatura de 28°C, timp de 24 h.
- Faza de inocul are loc în același condiții ca preinoculul, la un volum mai mare.
- În faza de bioproces are loc dezvoltarea și cultivarea tulpinilor bacteriene, utilizând medii nutritive ca la inocul.
- Mediile de cultură și condițiile de lucru sunt aceleași pentru tulpinile bacteriene utilizate: *Delftia lacustris* 6BS și *Pseudomonas* sp. 12BS.
- Pentru obținerea biomasei tulpinilor *Delftia lacustris* 6BS și *Pseudomonas* sp. 12BS temperatura de incubare este 28°C timp de 24 h și agitare 145 rpm.

Se da în continuare un exemplu de realizare a invenției :

Faza 1. Izolarea și identificarea tulpinilor bacteriene

Pentru obținerea unor tulpini noi de bacterii biostimulante cele două tulpini bacteriene au fost izolate pe medii selective din zone specifice.

Delftia lacustris 6BS NCAIM (P) B001396

Pentru izolare probele au fost luate din sol din Depresiunea Ciucului, rezervația naturală Mlaștina Borsáros din care au fost realizate soluții de sol și diluții seriale. Din fiecare diluție s-au luat probe de 0,1 ml care au fost folosite pentru inocularea mediilor de cultură King's B (20 g peptonă proteică, 10 ml glicerol, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g MgSO₄·7H₂O, 1 l de apă distilată, 18 g agar, pH = 7,2). Cultiile Petri inoculate au fost incubate la 28°C timp de 48 h.

Caracteristicile morfologice și biochimice a tulpinii *Delftia lacustris* 6BS sunt listate în tabelul 1.

Pseudomonas sp.12BS NCAIM (P) B001397

Pentru izolare probele au fost luate din sol din Depresiunea Ciucului, rezervația naturală Mlaștina Borsáros din care fost preparate soluții de sol și diluții seriale. Din fiecare diluție s-au luat probe de 0,1 ml care au fost folosite pentru inocularea mediilor de cultură King's B (20 g peptonă proteică, 10 ml glicerol, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g MgSO₄·7H₂O, 1 l de apă distilată, 18 g agar, pH = 7,2). Culiile Petri inoculate au fost incubate la 28°C timp de 48 h.

Caracteristicile morfologice și biochimice a tulpinii *Pseudomonas* sp.12BS sunt listate în tabelul 1.

Tabel. 1. Caracteristicile morfologice și biochimice a tulpinilor bacteriene.

	<i>Delftia lacustris</i> 6BS NCAIM (P) B001396	<i>Pseudomonas</i> sp.12BS NCAIM (P) B001397
Colorația Gram	-	+
Evidențierea sporiilor	-	-
Oxidarea glucozei	+	+
Tipul respirației	aerobă	aerobă

Identificarea a tulpinilor bacteriene a fost realizată pe baza secvențierii fragmentului 16S rADN (Tabel 2).

Tabel 2. Încadrarea taxonomică a tulpinilor pe baza secvențelor 16S rADN.

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN (perechi de baze - pb)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinilor pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile din GenBank (nr. de referință); - procentul de similaritate
6BS	439	TCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAG CCTTCATCCTGCACGCGGCAATTGCTGGATC AGGCTTTCGCCCATTGTCCAAAATTCCCA CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT GTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCGTCCTC TCAGACCAGCTACAGATCGTCGGCTTGGT AAGCTTTTATCCCACCACTACCTAATCTG CCATCGGCCGCTCCAATCGCGCGAGGCC GAAGGTCCCCGCTTTCATCCTCAGATCGT ATGCGGTATTAGCTACTCTTTCGAGTAGTT ATCCCCACGACTGGGCACGTTCCGATGT ATTACTACCCGTTCCGCACTCGTCAGCGT CCGAAGACCTGTTACCGTTCGACTTGCAT	<i>Delftia lacustris</i> DSM 21246(T) (EU888308) - similaritate: 100%

		GTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCT GAGCCATGGATCAAACCTCTAAAAAA	
12BS	354	TTATTGTGTCGGTACGTCAAACAATCACG TATTAGGTAAGTCCCTTCCTCCCAACTTA GGGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTC ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTT CGCCCATTTGTCCAATATTCCCCACTGCTGC CTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAG TTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACC AGTTACGGATCGTAGCCTTGGTGAGCCAT TACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAG GCTCATCTAATAGCGTGAGGTCCGAAGAT CCCCACTTTCTCCCGTAGGACGTATGCG GTATTAGCGCCCGTTTCCGGACGTTATCCC CC	<i>Pseudomonas sp.</i> - similaritate: 98%

Faza 2. Degradarea celulozei

Capacitatea degradării celulozei la tulpinile bacteriene a fost investigată pe medii CMC (1 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,2 g/L KCl, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L extract de drojdie, 26 g/L CM23 și 3 g/L agar) cu conținut de carboximetilceluloză având 23 de unități de glucoză (CM23). Plăcile Petri au fost inoculate punctiform și au fost incubate timp de cinci zile la 28°C. După incubare, mediile au fost colorate cu colorant roșu de Congo având concentrația 0,1%. Dacă bacteria are capacitatea de a produce celulază, în jurul culturii bacteriene se observă un halou opac. Prin determinarea dimensiunii inelului se obține o valoare numerică, iar activitatea celulazică a diferitelor tulpini devine comparabilă.

După cinci zile de incubație, tulpinile bacteriene *Delftia lacustris* 6BS și *Pseudomonas sp.* 12BS au arătat producția de enzime celulază cu diametrul haloului de 23 respectiv 28 mm.

Faza 3. Degradarea fitinei

Analiza producerii fitazei s-a realizat pe medii Sperber (10 g/L glucoză, 0,5 g/L extract de drojdie, 0,1 g/L CaCl_2 , 0,25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L agar și 2,5 g/L acid fitic, pH 7,2) cu conținut de acid fitic. Mediile nutritive s-au inoculat punctiform, urmat de o incubare la 28°C timp de cinci zile.

Tulpina bacteriană *Delftia lacustris* 6BS produce enzima fitazică, având un halo de diametrul 6 mm, tulpina bacteriană *Pseudomonas sp.* 12BS nu a arătat activitate fitazică.

Faza 4. Degradarea lecitinei

Gălbenușul de ouă conținând lecitină în mare cantitate, a fost folosită în determinarea producției lecitinazei. Acest test s-a realizat pe mediu agarizat cu conținut de gălbenuș de ouă (10 g/L peptonă, 1 g/L glucoză, 10 g/L NaCl, 5 g/L extract de drojdie, 22 g/L agar și 100 ml/L emulsie de gălbenuș de ou. Emulsia de gălbenuș de ou se prepară din 4 gălbenuș de ouă și 1000 ml, 0,85% de soluție de NaCl). Mediile de cultură au fost inoculate punctiform, și incubate la 28°C timp de cinci zile.

Tulpina bacteriană *Pseudomonas* sp. 12BS a arătat producția enzimei lecitinază, producând pe mediul de cultura un halo de diametrul 20 mm. Tulpina bacteriană *Delftia lacustris* 6BS nu prezintă activitate lecitinazică.

Faza 5. Detectarea genelor specifice *apr* (protează alcalină) și *npr* (protează neutră)

Pentru detectarea genelor *apr* și *npr* prin tehnica PCR am folosit amorse specifice, după cum urmează: FP *aprI* (5'-TAYGGBTTC AAYTCCAAYAC-3'), RP *aprII* (5'-VGCGATSGAMACRTTRCC-3'), FP *nprI* (5'-GTDGAYGCHCAYT AYTAYGC-3') și RP *nprII* (5'-ACMGCATGBGTYADYTCATG-3').

Înainte de detectării genelor am realizat o reacție PCR în gradient folosind o probă martor pozitivă (tulpina bacteriană *Pseudomonas fluorescens* pentru gena *apr* și *Bacillus cereus* pentru gena *npr*) în vederea optimizării atașării amorsoarelor. Reacția PCR în gradient a fost realizat la temperaturi între 49°C și 58°C. Rezultatul amplificării a fost verificat prin electroforeză în gel de agaroză. Amplificarea genelor specifice a tulpinilor de bacterii selectate au fost realizate la temperatura de aderență optimă, iar s-au pus în evidență producții de amplificare folosind tehnica electroforezei în gel de agaroză.

Am detectat prezența genei *apr* și la tulpina bacteriană *Delftia lacustris* 6BS și la tulpina bacteriană *Pseudomonas* sp. 12BS, obținând un produs de 194 pb, care reprezintă fragmentul genei *apr* comparat cu controlul pozitiv *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. În urma reacției de PCR nu s-a amplificat gena *npr* din probe, din care avem evidența că genomul izolatelor bacteriene nu conține gene omologice ai proteazelor neutre.

Faza 6. Obținerea biopreparatelor mineralizatoare de N și P

Pentru realizarea biomasei de *Delftia lacustris* 6BS NCAIM (P)B001396, tulpina bacteriană a fost cultivată pe mediu solid Nutrient timp de 24 h la 28°C. Din culturile bacteriene incubate pe mediu solid Nutrient a fost realizată suspensia de bază (folosind soluție

fiziologică sterilă). Numărul bacteriilor din acest suspensie de bază a fost setat la 10^8 UFC/ml. Aceasta suspensie bacteriană este folosită pentru realizarea preinoculului.

Cu suspensia de bază a fost inoculat preinoculul într-un vas Erlenmeyer de 100 ml care a conținut 20 ml de mediu lichid industrial. Mediul lichid industrial a conținut 25 g/L făină de soia, 1,25 g/L K_2HPO_4 și 1,25 g/L zahăr. Inocularea s-a efectuat cu o rată de 1:80, deci suspensia bacteriană a fost adăugată într-un procent de 1,25%. Preinoculul astfel pregătit a fost incubat la 28°C, timp de 24 de ore la 145 rpm.

Cultura astfel obținută s-a folosit în continuare la inocularea unui volum de 200 mL de mediu industrial într-un vas Erlenmeyer de 1 L, folosind un raport de inocul/mediu de 1:80. Cultura s-a menținut cu parametrii de proces de 28°C, cu agitare de 145 rpm timp de 24 de ore. Probe de câte 1 mL de cultură bacteriană a fost prelevat după 24 de ore, din care s-au determinat numărul unităților formatoare de colonii. Numărul unităților formatoare de colonii (UFC/mL) s-au determinat prin realizarea unor serii de diluții decimale și inocularea acestora pe mediu agarizat Nutrient, și cultivate la 28°C timp de 24 ore, în vederea stabilirii numărul celulelor viabile.

Tulpina bacteriană *Delftia lacustris* 6BS NCAIM (P)B001396 ajunge la o valoare de $2,66 \cdot 10^9$ celulă/mL în mediu lichid industrial după 24 de ore.

Pentru realizarea biomasei de *Delftia lacustris* 6BS NCAIM (P)B001396, tulpina bacteriană a fost cultivată pe mediu solid Nutrient timp de 24 h la 28°C. Din culturile bacteriene incubate pe mediu solid Nutrient a fost realizată suspensia de bază (folosind soluție fiziologică sterilă). Numărul bacteriilor din aceasta suspensie de bază a fost setat la 10^8 UFC/ml, fiind ulterior folosit pentru realizarea preinoculului.

Cu suspensia de bază a fost inoculat preinoculul într-un vas Erlenmeyer de 100 ml care a conținut 20 ml de mediu lichid industrial. Mediul lichid industrial a conținut 25 g/L făină de soia, 1,25 g/L K_2HPO_4 și 1,25 g/L zahăr. Inocularea a fost efectuat în 1:80 de rată, deci suspensia bacteriană a fost adăugată în 1,25%. Preinoculul astfel pregătit a fost incubat la 28°C, timp de 24 de ore la 145 rpm.

Cultura astfel obținută s-a folosit în continuare la inocularea unui volum de 200 mL de mediu industrial într-un vas Erlenmeyer de 1 L, folosind un raport de inocul/mediu de 1:80. Cultura s-a menținut cu parametrii de proces de 28°C, cu agitare de 145 rpm timp de 24 de ore. Probe de câte 1 mL de cultură bacteriană a fost prelevat după 24 de ore, din care s-au determinat numărul unităților formatoare de colonii (UFC/mL). Numărul unităților formatoare de colonii (UFC/mL) s-au determinat prin realizarea unor serii de diluții decimale și

inocularea acestora pe mediu agarizat Nutrient, și cultivate la 28°C timp de 24 ore, în vederea stabilirii numărului celulelor viabile.

Tulpina bacteriană *Pseudomonas* sp. 12BS NCAIM (P)B001397 ajunge la o valoare de $1,31 \cdot 10^9$ celulă/mL în mediu lichid industrial după 24 de ore.

Faza 7. Studiul efectului stimulator a biopreparatelor obținute asupra creșterii plantelor de grâu

1. Germinarea semințelor

Semințele de grâu sterilizate au fost germinate înainte de biotestare, germinare realizată pe hârtii de filtru timp de 48 de ore. Pentru germinare s-au folosit semințe de grâu comerciale având o greutate între 0,3 – 0,4 g. Pentru biotestarea *in vitro* a efectului fitostimulator a bacteriilor au fost folosite răsaduri având aceeași lungime de lăstar (1,5 – 2 cm).

2. Biotestarea in vitro a efectului fitostimulator asupra plantulelor în cultură hidroponică

În vederea creșterii plantelor s-au folosit cutii din polipropilenă de dimensiuni 34 x 23 x 16 cm, care pot fi închise cu capac și sunt rezistente la autoclavare. În aceste cutii au fost confecționate site din tablă de oțel inoxidabil (25 x 15 cm, înălțime 2 cm), cu diametrul orificiilor de 4 mm, iar distanța dintre orificii de 20 mm. Cutiile împreună cu site au fost sterilizate în prealabil prin autoclavare (121°C, 15 minute). Plănuțele cu lăstari de 1,5 – 2 cm lungime au fost învelite în fașă sterilă de 2x3 cm și au fost așezate peste orificiile sitei, la 4 cm distanță una față de cealaltă (30 de semințe/cutie). În vederea creșterii plantelor s-a folosit o soluție nutritivă, care conține elementele minime necesare (Mg, Ca, Cl, Mn, B, Zn, Fe) pentru creșterea și dezvoltarea plantelor. La soluție nutritivă a fost adăugată 1ml/L suspensie bacteriană cu 10^8 UFC/mL. Plantele au fost crescute 11 zile la 25°C, 70% de umiditate relativă, durata perioadei de iluminare fiind de 12 ore/zi la 2500 lux (în Sanyo MLR-351, Versatile Environmental Test Chamber, Japan). În cazul fiecărui experiment s-a folosit și probă martor, în cazul căreia soluțiile nutritive nu au fost inoculate cu bacterii. După perioada de creștere a fost măsurată biomasa proaspătă totală al plantelor, biomasa proaspătă și uscată al rădăcinilor respectiv al tulpinii (uscare: 80°C timp de 3-5 ore), respectiv lungimea tulpinii.

Plantele care au prezentat cea mai accentuată creștere a tulpinii (media lungimii tulpinilor: $11,8 \pm 0,96$ cm) au fost cei tratați cu tulpina bacteriană *Pseudomonas* sp. 12BS, având o rată de creștere crescută cu 37,33% față de plantele martor (media lungimii tulpinilor fiind $8,592 \pm 1,11$ cm), iar media lungimii tulpiniilor plantelor tratate cu tulpina bacteriană *Delftia lacustris* 6BS a fost $11,43 \pm 1,32$ cm (cu o rată de creștere crescută cu 33,054%).

Consoția bacteriană *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS a prezentat efecte benefice semnificative asupra lungimii tulpinilor plantelor, arătând o creștere 40,92% (media lungimii tulpinilor: 12,108±1,35 cm) față de proba martor (Fig. 1.a).

Analizând greutatea totală a plantelor și comparând cu cele martor (greutatea totală medie de 0,0768±0,01), pot fi observate diferențe semnificative în cazul tulpinilor *Delftia lacustris* 6BS (9,37%) și *Pseudomonas* sp. 12BS (14,06%) și în cazul consoției bacteriene *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS (16,66%) cu greutăți totale de 0,084±0,012 g, 0,0876±0,0011 g și 0,0896±0,013 g (Fig. 1.b).

Determinând greutatea umedă și uscată a rădăcinilor plantelor martor și celor tratate cu suspensii bacteriene, nu s-a observat creștere semnificativă (Fig. 1.c și 1.d). Determinând greutățile umede ale tulpinii plantelor, în cazul tulpiniei bacteriene *Pseudomonas* sp. 12BS am observat o creștere semnificativă de 15,78% (cu greutate medie 0,0616±0,0085 g) față de plantele martor (cu greutate medie 0,0532±0,0098 g) (Fig. 1.e). Totodată tulpina bacteriană *Delftia lacustris* 6BS – așa cum se vede pe figura 1.e și în tabelul 2 – nu a influențat semnificativ greutatea umedă a tulpinii plantelor. Analizând greutatea uscată a tulpinilor s-a observat că tulpinile *Delftia lacustris* 6BS (25,98%) și *Pseudomonas* sp. 12BS (37,17%) cauzează o creștere semnificativă a greutății medii față de plante martor (0,008188±0,0019 g) cu 0,0103±0,0019 g respectiv 0,0112±0,0013 g (Fig. 1.f).

Ceea ce privește greutatea umedă și uscată a tulpinii plantelor am observat o creștere semnificativă datorată consoției bacteriene *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS de 27,06% respectiv 23,59% față de proba martor (Fig. 1.e și 1.f).

3. Biotestarea in vitro a efectului fitostimulator asupra plantulelor în trei tipuri de sol

Pentru testarea efectelor benefice a bacteriilor asupra plantelor de grâu crescute în sol au fost selectate cele trei tipuri de sol caracteristice zonei Depresiunii Ciucului: sol cernozimoid, sol brun argiloiluvial, respectiv sol nisipos sau psamosol tipic lamelar. Probele de sol au fost prelevate din orizonturile superioare ale solului (0-30 cm). Pentru creșterea plantelor s-au folosit cutii din polipropilenă, de dimensiuni 34 x 23 x 16 cm (6,5 litru), care pot fi închise cu capac și sunt rezistente la autoclavare. În cutii au fost puse 5 litri de sol, acestea fiind sterilizate prin autoclavare la 105°C timp de 30 de minute, repetate de trei ori în trei zile consecutive. În fiecare cutie au fost însămânțate 25 semințe de grâu germinate, și la baza fiecărei plântuțe s-a adăugat 1 ml de inoculant bacterian (10^8 UFC/ml/plantă). În experimente au fost folosite cele trei tipuri de sol, la care s-a adăugat consoția bacteriană *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS. În cadrul experimentelor s-au folosit probe martor,

în cazul cărora plântuțele de grâu nu au fost inoculate cu bacterii. Plantele de grâu au fost crescute timp de zece zile la 28°C, 80% de umiditate relativă, durata perioadei de iluminare fiind de 12 ore/zi cu 2500 lux (în Sanyo MLR-351, Versatile Environmental Test Chamber, Japan). Umiditatea solului a fost ținută la 13,5% din masa totală uscată. După perioada de creștere a fost măsurată biomasa proaspătă totală a plantelor, biomasa proaspătă și uscată al rădăcinilor și a tulpinii (uscare: 80°C timp de 3-5 ore), respectiv lungimea tulpinii. În cadrul fiecărui experiment am avut 25 repetiții (25 plântuțe), și astfel s-a calculat valoarea medie, respectiv deviația standard (standard deviation).

3.1. Biotestarea in vitro al efectului fitostimulator a tulpinilor bacteriene asupra plantulelor în sol cernoziomoid

Valoarea medie a lungimii tulpinilor în cazul plantelor tratate cu consorția *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS a fost de 16,21% (30,24±2,73 cm) mai mare în comparație cu plantele martor (26,02±3,41 cm), diferența fiind statistic semnificativă (Fig. 2.a). Pe baza rezultatelor am observat că media greutateii totale (biomasa proaspătă) a plantelor tratate cu consorția bacteriană *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS a fost 0,286±0,051 g, ceea ce înseamnă o creștere de 88,42% față de probele martor, neinoculate (0,152±0,023 g) (Fig. 2.b).

Consoția bacteriană a stimulat vizibil creșterea greutateii umede a rădăcinilor plantelor, aceste diferențe fiind statistic semnificative: creșterea a fost 293,1% în cazul consorției *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS (0,114±0,034 g) față de martor (0,029±0,0087 g) (Fig. 2.c). Totodată în cazul greutateii uscate a rădăcinilor a fost observat influențe semnificative cu creștere de greutate de 104,64% (0,029±0,011 g) față de martor (0,014±0,0023 g) (Fig. 2.d).

Consoția bacteriană a avut efect benefic, statistic semnificative ($p < 0,001$) și asupra greutateii umede a tulpinilor plantelor, diferența fiind 44,74% (0,17±0,027 g) față de martor (0,118±0,019 g) (Fig. 2.e). Totodată în cazul greutateii uscate a tulpinilor am obținut diferențe semnificative de 45,45% (0,018±0,0023 g) cu consorția bacteriană *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS față de martor (0,013±0,0011 g) (Fig. 2.f).

3.2. Biotestarea in vitro al efectului fitostimulator a tulpinilor bacteriene asupra plantulelor în sol argiloiluvial

Consoția bacteriană *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS a avut efect benefic (statistic semnificative) asupra creșterii greutateii (biomasei) totale a plantelor, cele inoculate având o creștere cu 18,55% (0,26±0,042 g) mai mare față de plantele martor (0,22±0,018 g),

neinoculate (Fig. 3.b). În ceea ce privește lungimea tulpinii plantelor, nu am observat efecte pozitive în urma tratării cu inoculant (Fig. 3.a).

În cazul greutateii umede a rădăcinilor plantelor inoculate cu consorția bacteriană *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS am obținut o creștere de 89,62% ($0,102 \pm 0,023$ g) față de plantele netratate ($0,054 \pm 0,011$ g), diferența fiind statistic semnificativă ($p < 0,0001$) (Fig. 3.c). Valorile greutateii uscate a rădăcinii plantelor tratate ($0,021 \pm 0,0089$ g) au fost mai mici față de plantele martor ($0,028 \pm 0,0077$ g), această diferență nefiind statistic semnificativă (Fig. 3.d). Totodată consorția bacteriană a dat diferențe semnificative (11,31%) în greutatea uscată a tulpinii plantelor tratate ($0,017 \pm 0,0029$ g) față de plantele netratate ($0,015 \pm 0,0012$ g).

3.3. Biotestarea in vitro al efectului fitostimulator a tulpinilor bacteriene asupra plantulelor în sol nisipos

În cazul folosirii a solului nisipos creșterea greutateii totale a plantelor tratate cu consorția bacteriană *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS a fost semnificativ mai mare (101,13%, $0,354 \pm 0,059$ g) față de plantele martor ($0,176 \pm 0,018$ g), aceste diferențe fiind statistic semnificative (Fig. 4.b). Consorția bacteriană *D. lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS nu a avut efecte benefice semnificative asupra lungimii tulpinii plantelor, a dat un procent de creștere de 25,82% ($34,58 \pm 1,77$ g) față de plantele martor ($27,49 \pm 1,83$ g) (Fig. 4.a).

În urma tratării plantelor cu consorția bacteriană am obținut o creștere importantă, statistic semnificativă ($p < 0,0001$) în cazul greutateii umede a rădăcinilor 318,57% ($0,11 \pm 0,048$ g) față de plantele netratate ($0,028 \pm 0,0063$ g) (Fig. 4.c). Consortia bacteriana nu a influențat semnificativ greutatea uscată a rădăcinii plantelor tratate (Fig. 4.d).

Ceea ce privește greutatea umedă a tulpinii plantelor, în urma folosirii biopreparatului am obținut efect pozitiv statistic semnificativ ($p < 0,0001$), diferențele față de plantele martor ($0,135 \pm 0,016$ g) fiind cu 73,33% ($0,234 \pm 0,044$ g) mai mare (Fig. 4.e). Consorția a arătat efect benefic (58,06%, $0,023 \pm 0,0024$ g) și asupra greutateii uscate a tulpinii plantelor față de plantele martor ($0,015 \pm 0,0016$ g) (Fig. 4.f).

21

REVENDICARI

1. Biopreparatul microbial cu efect biofertilizant caracterizat prin aceea ca este compus din tulpina *Delftia lacustris* 6BS depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numar de depozit NCAIM (P) B001396 si tulpina *Pseudomonas sp.*12BS depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numar de depozit NCAIM (P) B001397, avand capacitatea de a promova cresterea plantelor prin mobilizarea elementelor nutritive din surse organice.

1.1 Conform revendicarii 1 tulpina *Delftia lacustris* 6BS caracterizat prin aceea ca are capacitate de degradare a celulozei, fitinei si a proteinelor, eliberand astfel elemente nutritive.

1.2 Conform revendicarii 1 tulpina *Pseudomonas sp.*12BS are capacitate de promovare a cresterii plantei caracterizat prin aceea ca are capacitate de degradare a celulozei, lecitinei si a proteinelor, eliberand astfel elemente nutritive.

2. Procedeu de obtinere a unor produse biologice active cu rol de biofertilizare caracterizat prin aceea ca aceasta cuprinde obtinerea unui inocul, prin cultivarea tulpinii *Delftia lacustris* 6BS si *Pseudomonas sp.*12BS pe medii care contin zaharoza ca sursa de carbon, faina de soia ca sursa de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare, amestecarea celor doua biomase obtinute in raport gravimetric de 1:1, care se poate aplica pe samanta sau plantula sau sol.

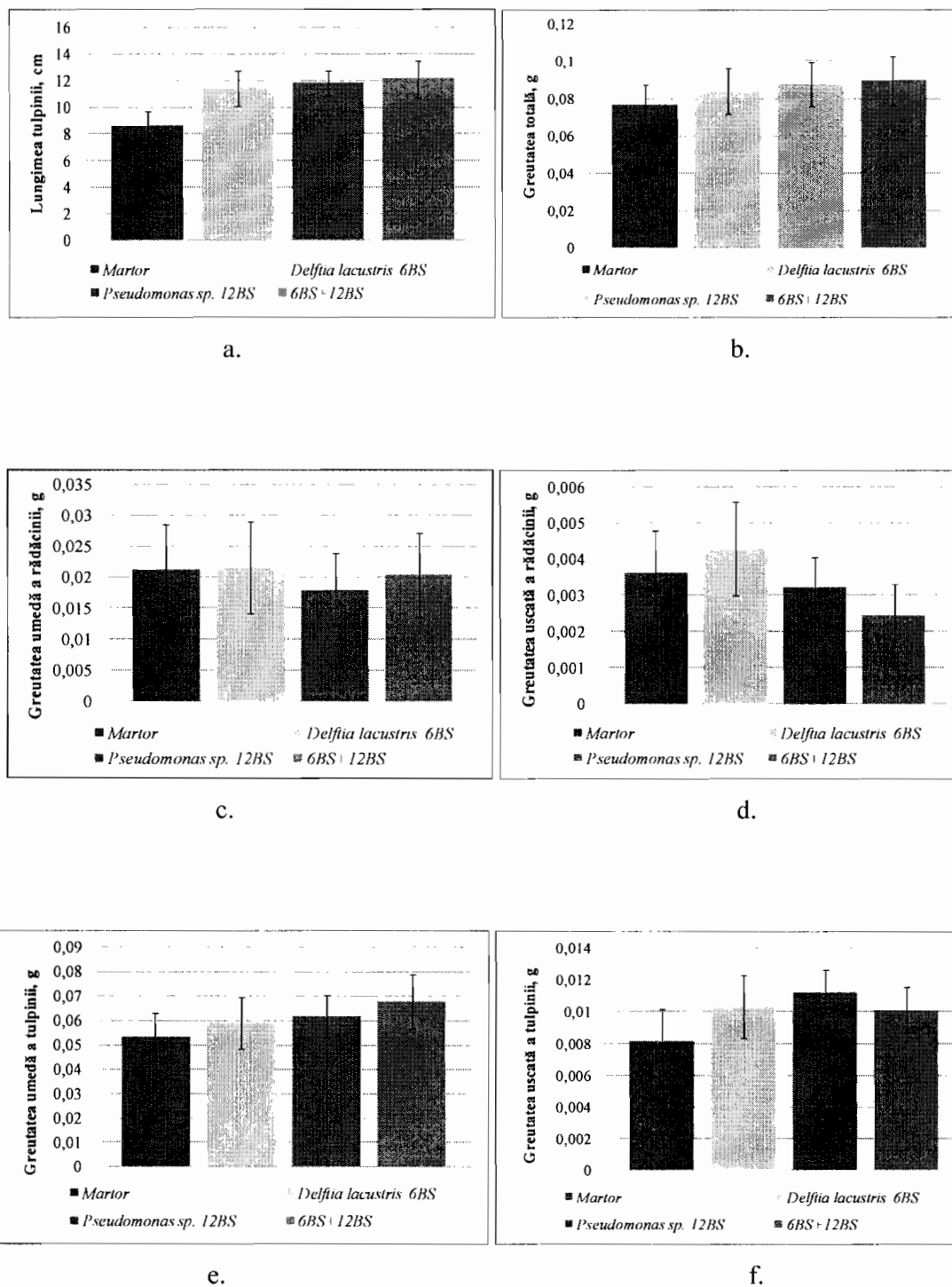


Figura 1. Cresterea plantelor netratate și tratate cu tulpinile bacteriene *Delftia lacustris* 6BS, *Pseudomonas sp. 12BS* și consorția bacteriană *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas sp. 12BS* în cultură hidroponică

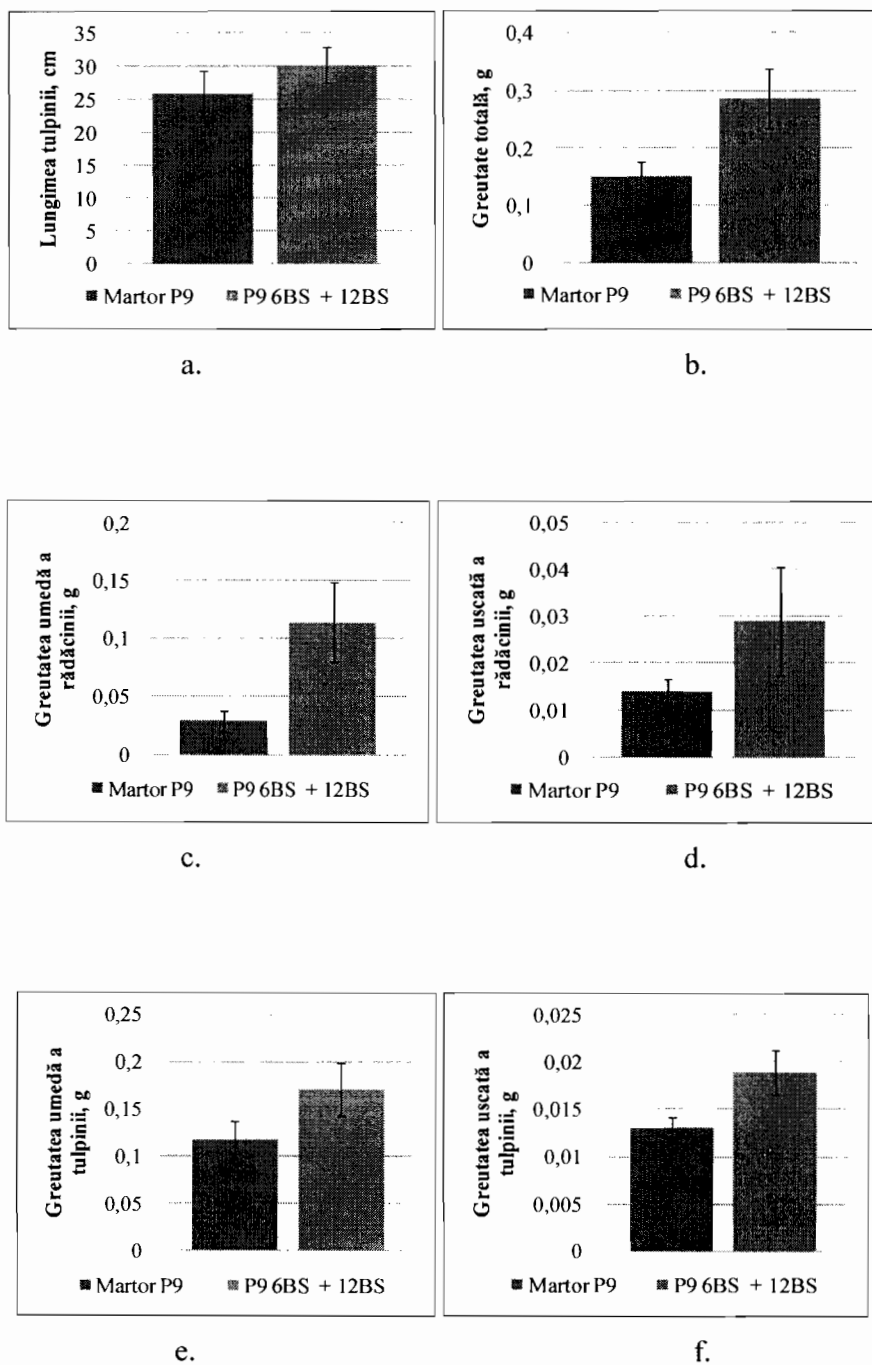


Figura 2. Cresterea plantelor netratate și tratate cu consorția bacteriană *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS în sol cernoziomoid

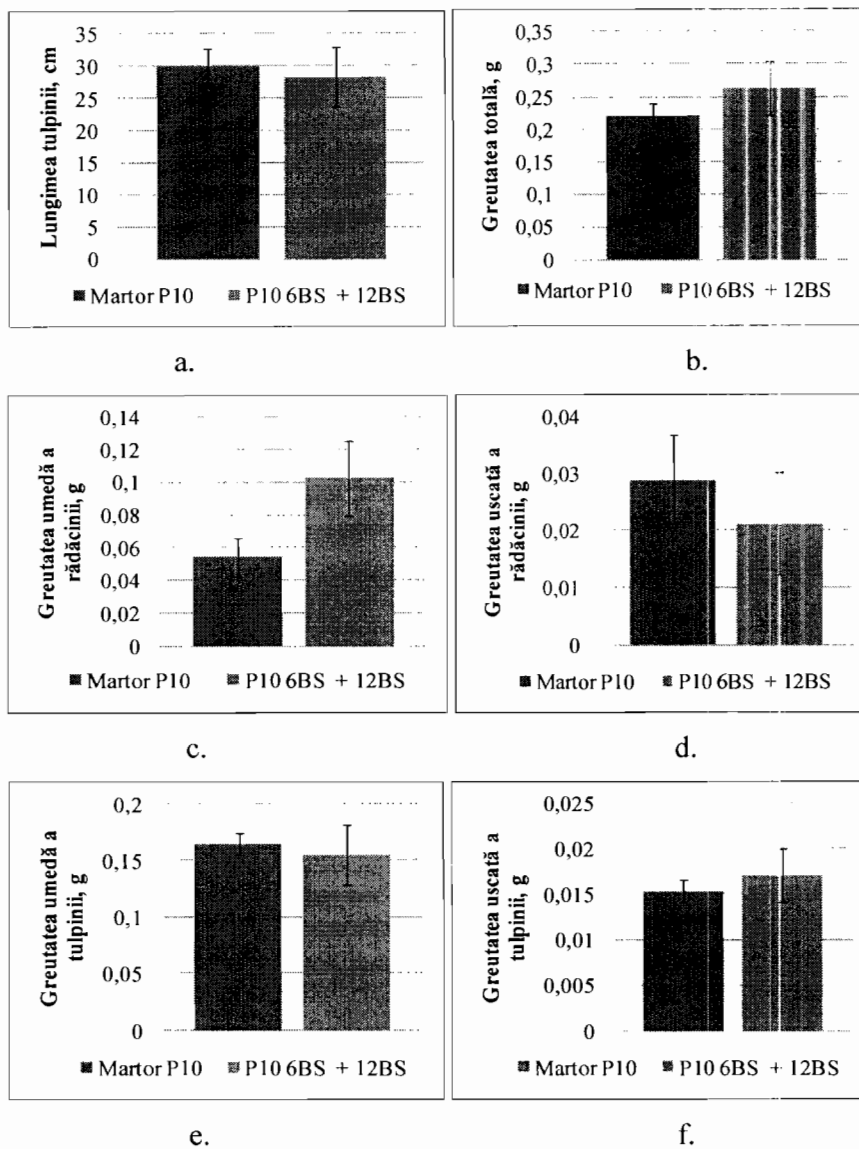


Figura 3. Cresterea plantelor netratate și tratate cu consorția bacteriană *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS în sol argiloiluvial

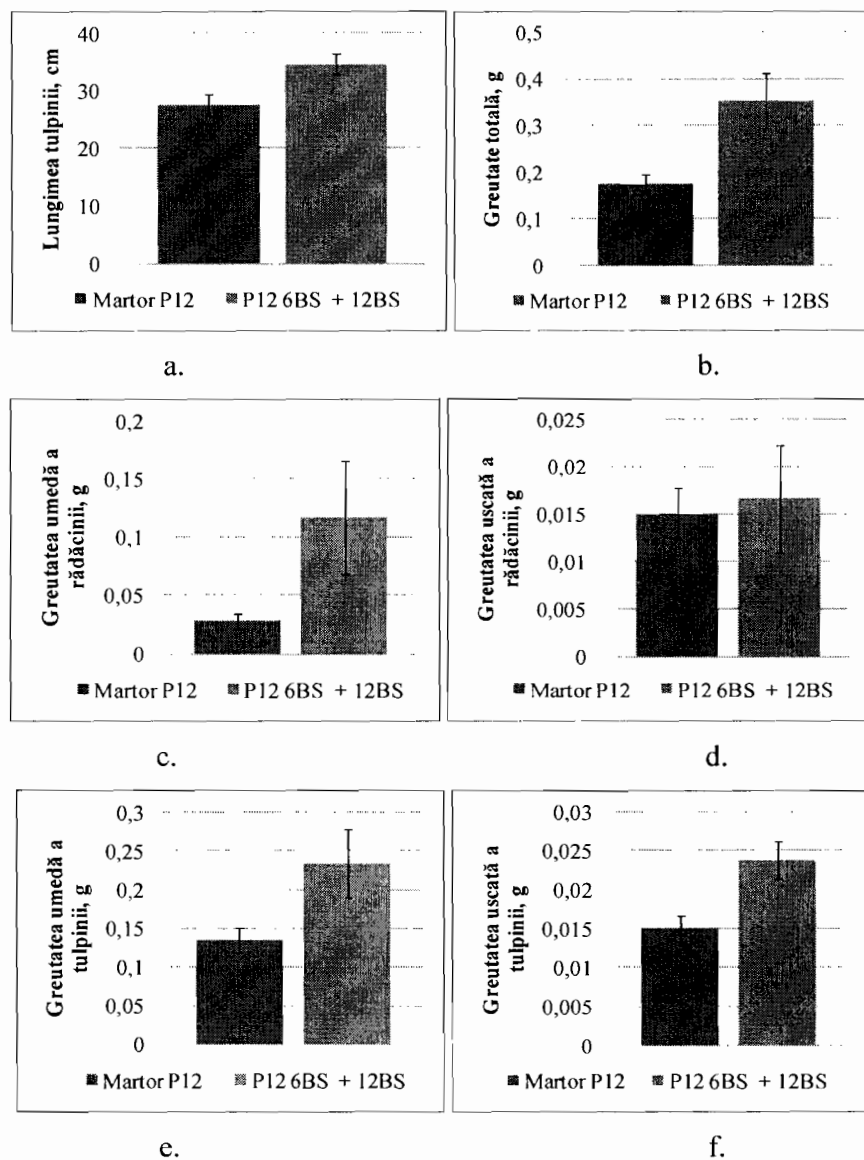


Figura 4. Creșterea plantelor netratate și tratate cu consorțiul bacterian *Delftia lacustris* 6BS + *Pseudomonas* sp. 12BS în sol nisipos