



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00420

(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:
• MARA GYONGYVER, PIAȚA LIBERTĂȚII
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• LASLO EVA, BD. FRĂȚIEI NR. 2, SC. E,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• SZENTES SAROLTA, STR. LUNCA MARE
NR. 22, SC. A, AP. 4, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• TAMAS EVA, STR. CARPAȚI NR. 34A,
GHEORGHENI, HR, RO;

• GYORGY EVA, STR. TOPLIȚA NR. 50,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• MATHE ISTVAN,
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR. 4,
SC. A, AP. 24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• ABRAHAM BEATA, STR. CULMEI BL. 11,
SC. C, AP. 16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LANYI SZABOLCS ȘTEFAN, 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 MIXT CU EFECT BENEFIC COMPLEX ASUPRA CREȘTERII PLANTELOR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

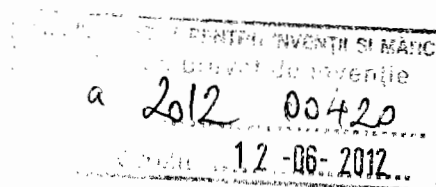
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un biopreparat microbian mixt, folosit ca biopesticid complex cu efect benefic pentru creșterea și protecția plantelor, compus din două tulpini bacteriene, și la un procedeu de obținere a acestuia. Biopreparatul microbian, conform invenției, este constituit din tulpinile *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas jessenii* T11, izolate din țesuturile unor briofite și din rizosfera plantei *Vicia sepium*, asociate în raport gravimetric de 1:1:1. Procedeu de obținere a biopreparatului constă în aceea că acesta cuprinde obținerea unui inocul prin cultivarea tulpinii *Delftia lacustris* 6BS pe medii care conțin melasă, ca sursă de carbon, extract de porumb și sulfat de amoniu,

ca sursă de azot, și săruri minerale, la o temperatură de 28°C, timp de 24 h, a tulpinii *Serratia fonticola* B17, pe medii care conțin zaharoză, ca sursă de carbon, făină de soia, ca sursă de azot, și săruri minerale, la o temperatură de 28°C, timp de 24 h, cu agitare, și a tulpinii *Pseudomonas jessenii* T11 pe medii care conțin melasă, ca sursă de carbon, extract de porumb, ca sursă de azot, și săruri minerale, la 28°C, timp de 24 h, și amestecarea celor trei biomase obținute, în raport gravimetric de 1:1:1.

Revendicări: 2
Figuri: 1





BIOPREPARAT MICROBIAN MIXT CU EFECT BENEFIC COMPLEX ASUPRA CREȘTERII PLANTELOR

Prezenta invenție se referă la un biopreparat microbial mixt compus din trei tulpini bacteriene folosit ca biopreparat cu efect benefic complex în agricultura modernă, și la procedeul de obținere acestuia.

Studiile de literatură evidențiază rolul important în agricultura durabilă a bacteriilor care promovează creșterea plantelor (bacterii PGPR) datorită caracterelor benefice cu care contribuie fie la mobilizarea nutrienților pentru plante fie la protecția plantelor. Aceste bacterii contribuie la creșterea și dezvoltarea plantelor prin diferite mecanisme directe și indirecte: solubilizarea nutrienților din minerale, fixarea azotului atmosferic, antagonism împotriva microorganismelor fitopatogene, inducerea rezistenței sistemice în planta gazdă respectiv creșterea toleranței de stres și producerea fitohormonilor (Vale Barreto Figueiredo și colab., 2010).

Studii referitoare la efectul combinat și/sau sinergic a microorganismelor PGPR sunt relativ puține, consorții bacteriene biocontrol pe bază de *Bacillus subtilis* și *Pseudomonas fluorescens* au fost testate pe chili (Sundaramoorthy și colab., 2012), iar un consorțiu pe bază de microorganisme *Pseudomonas-Azospirillum-Glomus* cu efect biofertilizant a fost testat pe plantele de porumb (Walker și colab., 2012), iar creșterea plantelor de *Jatropha* a fost promovată de consorția bacteriană pe bază de patru bacterii: *Brevibacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus sp.* și *Acinetobacter calcoaceticus* (Jha și Saraf, 2012).

Aceste biopreparate au dezavantajul că nu prezintă efectele scontate datorită specificității nișelor ecologice, a relației dintre plantă-microorganism, totodată aceste efecte benefice sunt influențate de condițiile pedologice și climatice specifice regiunii.

Problema pe care rezolvă invenția este realizarea unui biopreparat bacterian compus din tulpina *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas jessenii* T11 pentru promovarea creșterii și protecția plantelor.

Biopreparatul microbial conform invenției este constituit din tulpina *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas jessenii* T11 pentru promovarea creșterii și protecția plantelor.

Cele trei tulpini bacteriene *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola* B17, *Pseudomonas jessenii* T11 sunt depuse la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta cu numere de depozit NCAIM P(B)001396, NCAIM P(B)001399 și NCAIM P(B)001394.

Procedeul de obtinere a unor biopreparate cu efect benefic complex cu ajutorul tulpinilor bacteriene *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola* B17, *Pseudomonas jessenii* T11 izolate din țesuturile unor briofite și din rizosfera plantei *Vicia sepium* conform invenției, consta in aceea ca, cuprinde obtinerea unui inocul, prin cultivarea tulpinii *Delftia lacustris* 6BS pe medii care contin melasa ca sursa de carbon, extract de porumb, sulfat de amoniu ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h, a tulpinii *Serratia fonticola* B17 pe medii care contin zaharoza ca sursa de carbon, faina de soia ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare și a tulpinii *Pseudomonas jessenii* T11 care contin melasa ca sursa de carbon, extract de porumb ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h , amestecarea celor trei biomase obtinute in raport gravimetric de 1:1:1, care se aplica pe samanta sau plantula sau sol.

Prin realizarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- prin acest invenție se dă o propunere pentru o nouă consorție bacteriană cu efect complex
- această consorție bacteriană contribuie la mobilizarea substanțelor nutritive și la inhibarea patogenilor
- prin producerea fitohormonului sistemul radicular devine mai dezvoltat contribuind la absorbția mai eficientă a nutrienților
- prin mecanismul solubilizării a fosfatului anorganic contribuie la creșterea accesibilității a fosfatului pentru plante

Tulpinile bacteriene *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola* B17 și *Pseudomonas jessenii* T11 folosite in procesul biotehnologic sunt izolate din sol , din țesuturile unor briofite și din rizosfera plantei *Vicia sepium* si caracterizate genetic prin identificare.

Biopreparatul microbial cu efect benefic complex asupra plantelor s-a obtinut cu un amestec de tulpini microbiene si anume tulpina bacteriana *Delftia lacustris* 6BS originară din sol , *Serratia*

fonticola B17 originară din țesuturile unor briofite și *Pseudomonas jessenii* T11 originară din rizosfera plantelor leguminoase.

Pentru mediile de cultivare, s-au folosit ca surse de carbon: zaharoza, melasa, ca surse de azot: făină de soia, extract de porumb. În afara de aceste materii prime, s-au folosit și saruri minerale care conțin calciu, fier, potasiu, fosfor, magneziu.

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

Procedul 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, *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas jessenii* T11 pe medii propice fiecărui tulpini. Aceste conțin surse de carbon: zaharoza, melasa, ca surse de azot: făină de soia, extract de porumb și saruri minerale.

- Dezvoltarea tulpinilor de microorganisme are loc la temperatura de 28°C, timp de 24 h.

- Faza de inocul are loc în aceleași condiții ca preinoculul sau, la un volum mai mare de mediu de cultura.

- În faza de bioproces are loc dezvoltarea și cultivarea tulpinilor bacteriene, utilizând mediu de cultivare diferit față de inocul.

- Mediile de cultura sunt diferite în funcție de tulpinile bacteriene utilizate: *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas jessenii* T11 dar condițiile de lucru sunt aceleași.

- Pentru obținerea biomasei tulpinilor *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola B17* și *Pseudomonas jessenii* T11 temperatura de incubare este 28 °C timp de 24 h și agitare 200 rpm.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

Faza I. Izolarea și identificarea bacteriilor benefice

Delftia lacustris 6BS NCAIM (P) B001396

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.

Serratia fonticola B17 NCAIM (P) B 001399

Pentru izolarea tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17 am propus prelevarea probelor din rezervația naturală Mlaștina Borsáros din țesuturile briofitelor (*Bryophyta*). 50 mg de plante de briofite se dizolvă în 10 ml de ser fiziologic (soluție de NaCl 0,9 %). Din această soluție se transferă 1 ml în 9 ml de ser fiziologic, obținând diluția 10^{-1} . Din această soluție se transferă din nou 1 ml în 9 ml de ser fiziologic, obținând diluția 10^{-2} . Din fiecare diluție se transferă 0,1 ml în medii de cultură selective. Probele se incubează 24 ore, la 28 °C. Mediul de cultură folosit are următoarea compoziție: hidrolizat pancreatic de gelatină 17 g, digestie pancreatică de cazeină și digestie pepsică de țesut animal 3 g, lactoză 10 g, săruri biliare 1,5 g, NaCl 5 g, roșu neutru 20 mg, cristal violet 1 mg, agar-agar 13,5 g, apă distilată 1000 ml

După obținerea culturilor pure, acestea au fost păstrate pe mediu Nutrient (peptonă 5 g, NaCl 5 g, extract de drojdie 2 g, extract de carne 1 g, agar-agar 15 g, apă distilată 1000 ml).

Pseudomonas jessenii T11 NCAIM P(B)001394

Pentru izolarea *Pseudomonas jessenii* T11 probele au fost prelevate din Munții Ciucului din rizosfera plantelor leguminoase *Vicia sepium* L.

Din probele de sol am preparat diluții seriate, din care a fost diseminată 0,1 ml pe suprafața mediului selectiv YEM (manitol 10 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $CaCl_2$ 0.2 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.2 g, extract de drojdie 0.01 g, agar-agar 20 g, apă distilată 1000 ml și albastru de bromtimol, pH=6.9). Cutiile Petri inoculate au fost incubate la 28°C timp de 48 h.

Tabel. 1. Caracteristicile morfologice și biochimice a tulpinilor bacteriene

	<i>Delftia lacustris</i> 6BS NCAIM (P) B001396	<i>Serratia fonticola</i> NCAIM P(B)001399	<i>Pseudomonas jessenii</i> T11 NCAIM P(B)001394
Colorația Gram	negativă	negativă	negativă
Evidențierea sp.lor	negativă	negativă	negativă
Oxidarea glucozei	pozitivă	pozitivă	pozitivă
Oxidarea lactozei	-	negativă	negativă
Reducerea nitraților	-	pozitivă	pozitivă
Testul gelatinoliză	-	pozitivă	negativă
Tipul respirației	aerobă	aerobă	aerobă
Producere de amoniac	-	-	pozitivă

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 CCTTCATCCTGCACGCGGCATTGCTGGATC AGGCTTTCGCCCCATTGTCCAAAATTCCCCA CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT GTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCGTCCTC TCAGACCAGCTACAGATCGTCGGCTTGGT AAGCTTTTATCCCACCAACTACCTAATCTG CCATCGGCCGCTCCAATCGCGCGAGGCC GAAGGTCCCCCGCTTTTATCCTCAGATCGT ATGCGGTATTAGCTACTCTTTCGAGTAGTT ATCCCCCAGCACTGGGCACGTTCCGATGT ATTACTACCCCGTTCCGCACTCGTCAGCGT CCGAAGACCTGTTACCGTTCGACTTGCAT GTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCT GAGCCATGGATCAAACCTCTAAAAAA	<i>Delftia lacustris</i> DSM 21246(T) (EU888308) - similaritate: 100%
B17	396	CCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAA CCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCAT GGCTGCATCAGGCTTGGCCCCATTGTGCA ATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT CTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCT GGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCG TCGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACT AGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGG TGTGAGGCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGT CCGAAGACGTTATGCGGTATTAGCTACCG TTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGGCA GNTTCCCAGACATTACTACCCGTCGCGC GCTCGTCACCCAGGAGCAAGCTCCNTGTG CTACCGCTCGACGTG	<i>Serratia fonticola</i> DSM 4576 (AJ233429) - similaritate: 99,8%
T11	464	ACAGCAAAGTATTAATTTACTGCCCTTCCT CCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAG ACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGA TCAGGCTTTCGCCCCATTGTCCAATATTCCC CACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC GTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCC TCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTG GTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAAT CCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGG CCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGG ACGTATGCGGTATTAGCGTTCTTTTCGAA ACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGATTCC TAGGCATTACTACCCGTCGCGCGCTGAA TCCAGGAGCAAGCTCCTCTCATCCGCTCG ACTTGATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCG TTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTCA	<i>Pseudomonas jessenii</i> CIP 105274(T) (AF068259) 99,1%

Faza 2. Determinarea activității proteazelor alcaline

Activitatea proteazelor s-a determinat din supernatantul culturilor bacteriene 24 ore, folosind caseină ca substrat. Absorbanța tirozinei rezultat în urma activității enzimatice s-a măsurat cu un cititor de microplăci (Fluostar Optima, BMG Labtech) la momentul începerii experimentului și după o oră de incubare.

Activitatea proteazelor alcaline a fost determinată în funcție de absorbanța tirozinei care în cazul tulpinei bacteriană *Delftia lacustris* 6BS NCAIM P(B)001396 a fost 0,2568 U/ml.

Faza 3. Determinarea activității fosfatazelor alcaline

În cursul analizelor structura membranară a fost distrusă prin sonicare, iar activitatea enzimatică a fost determinată în prezența substratului p-nitrofenil fosfat.

În funcția absorbanței p-nitrofenolului rezultat s-a determinat activitatea fosfatazelor alcaline care în cazul tulpinei bacteriană *Delftia lacustris* 6BS NCAIM P(B)001396 a fost 0,3881 U/ml.

Faza 4. Producerea cianurii de hidrogen

Pentru analiza producerii de cianură de hidrogen, am folosit o metodă calitativă. Din tulpina bacteriană *Serratia fonticola* B17 se obține o cultură de 24 ore în mediu lichid Nutrient. Mediul lichid Nutrient are următoarea compoziție: peptonă 5 g, NaCl 5 g, extract de drojdie 2 g, extract de carne 1 g, apă distilată 1000 ml. Din cultura bacteriană obținută 0,1 ml se transferă în plăci Petri care conține mediu agarizat Nutrient suplimentat cu glicină (4,4 g/l). O bucată de hârtie filtru steril impregnată într-o soluție de 0,5 % acid picric în 2% Na₂CO₃, se așează în fundul părții de acoperire a plăcilor Petri. Plăcile inoculate închise cu parafilm, se incubează timp de 4 zile, la 28 °C. Schimbarea culorii a hârtiei filtru din culoarea galbenă în portocaliu sau maro indică producerea cianurii de hidrogen.

În cazul tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 s-a observat o schimbare în culoarea hârtiei filtru (din galben în portocaliu), care confirmă producerea cianurii de hidrogen de către tulpina testată.

Faza 5. Antagonism împotriva ciupercilor fitopatogenelor *Fusarium oxysporum* și *Alternaria alternata*

Pentru determinarea antagonismului împotriva speciilor fitopatogene susnumite s-a folosit o metodă cantitativă. Speciile fungice se însămânțează pe suprafața mediului nutritiv Complex prin striere. Mediul nutritiv Complex are următoarea compoziție: peptonă 10 g, glucoză 40 g, extract de drojdie 10 g, agar-agar 20 g, apă distilată 1000 ml. După însămânțare, în mediu se fac

găuri, cu diametru de 5 mm, în care se pipetează 100 µl din supernatantul speciei bacteriană studiată obținut prin metoda descrisă de mai jos.

Cultura bacteriană *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 se obține în mediu Nutrient lichid, incubat timp de 5 zile, la 28 °C și 150 RPM. După incubare o cantitate de 1,5 ml din culturile crescute se centrifughează la 12000 RPM timp de 30 minute.

Plăcile Petri inoculate cu specia fungică și supernatantul culturii bacteriene se incubează timp de 5 zile. Testul de antibioză se repetă de 5 ori. După incubare se măsoară zona de inhibiție. Valorile medii a zonelor de inhibiție se găsesc în tabelul 3.

Tabel 3. Testarea in vitro a activității antagoniste a tulpinii *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 asupra creșterii miceliene a unor specii fungice patogene

	Specia fungică fitopatogenă studiată	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Zona de inhibiție indusă (cm)	4,4	1,8

Faza 6. Determinarea capacității de solubilizare a fosfaților anorganici la tulpina bacteriană cu caracter de mobilizare a fosfaților .

Bacteriile cu capacitatea de solubilizare a fosfaților anorganici sunt selectate prin metoda inoculării pe medii nutritive Pikovskaya cu conținut de fosfat tricalcic.

Mediul de cultură Pikovskaya are următoarea compoziție: extract de drojdie 0.5 g, dextroză 10 g, fosfat de calciu 5 g, sulfat de amoniu 0,5 g, KCl 0,2 g, MgSO₄ 0,1 g, MnSO₄ 0,0001 g, FeSO₄ 0,001 g, agar-agar 20 g, 1000 ml apă distilată.

În cazul microbilor cu capacitate de mobilizare a fosfaților, în jurul coloniilor dezvoltate culoarea mediului devine transparentă, datorită producerii acizilor organici.

Tulpina bacteriană *Pseudomonas jessenii* T11 NCAIM P(B)001394 de 24 h au fost inoculate pe mediile Pikovskaya și incubate 48 h la 28° C. În jurul coloniei bacteriene dezvoltate culoarea mediului devine transparentă, datorită producerii acizilor organici cărui diametru a fost de $2,49 \pm 0,05$ mm.

Faza 7. Determinarea capacității de producere a fitohormonului auxinic (acidul 3-indolil acetic)

Analiza producerii a acidului 3-indolil acetic a fost realizat calitativ și cantitativ.

Determinarea calitativă a producerii acidului 3-indolil acetic a fost realizat pe mediu de inoculate pe plăcile Petri agarizate, după care a fost depusă membrane de nitroceluloză cu

dimensiune de 1x1 cm asupra coloniilor. După incubare la 28°C de 24 h, membrana de nitroceluloză a fost impregnată în reactiv Salkovski. Apărarea culorii roșie a însemnat capacitatea de producere a acidului 3-indolil acetic.

Pentru determinarea cantității a acidului 3-indolil acetic produs, tulpina bacteriană de *Pseudomonas jessenii* T11 NCAIM P(B)001394 a fost inoculat în medii lichide TSB cu conținut de triptofană de 100 µg/ml și incubate 72 h la 150 rpm. După incubare suspensia bacterienă a fost centrifugată la 5000 rpm 15 min și 1 ml de supernatant a fost adăugat la 2 ml de reactiv Salkovski și incubat circa 25-30 min la temperatura camerei. Absorbanța soluției a fost determinată la 530 nm.

Curba de calibrare a fost realizată prin determinarea absorbției la 530 nm a unor soluții conținând acid 3-indolil acetic în diferite concentrații (5-, 10-, 15-, 20-, 25 µg/ml). Cantitatea acidului 3-indolil produs de tulpinile bacteriene studiate a fost calculat pe baza curbei de calibrare. Cantitatea auxinului produs de către tulpina bacteriană de *Pseudomonas jessenii* T11 NCAIM P(B)001394 este 18,12 µg/ml.

Faza 8. Obținerea biomasei bacteriene prin fermentație

Mediul lichid industrial a conținut 25 g/L făină de soia, 1,25 g/L K₂HPO₄ și 1,25 g/L zahăr.

Din culturile bacteriene incubate pe mediu solid Nutrient la 28°C, timp de 24 de ore, a fost realizată suspensia de bază (folosind soluție fiziologică sterilă). Numărul bacteriilor din acest suspensie de bază a fost setat la 108 UFC/ml. Cu suspensia de bază a fost inoculat preinoculul într-un lombic 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 K₂HPO₄ și 1,25 g/L zahăr. Inocularea a fost efectuat în 1:80 de rată, deci suspensia bacteriană a fost adăugat 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 lombic Erlenmeyer de 1 l, folosind un raport de inocul/mediu de 1:80. Cultura s-a menținut cu parametrii de proces de 28°, 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° timp de 24 ore, în vederea stabilirii numărul celulelor viabile.

Tulpina bacteriană cu caracter demineralizatoare de *N* și *P* *Delftia lacustris* 6BS NCAIM (P)B00139 ajunge la o valoare de $2,66 \times 10^9$ celulă/mL în medie lichid industrial după 24 de ore.

Pentru realizarea biomasei de *Pseudomonas jessenii* T11 NCAIM P(B)001394, tulpina bacteriană a fost cultivată în 50 ml mediu de cultură lichidă de Nutrient timp de 24 h la 28°C la 200 rpm, în baloane de 250 ml. Acest suspensie bacteriană de 24 h este aplicat pentru realizarea preinoculului.

Mediul de cultură a preinoculului și inoculului conține: melasă 20 g/l, extract de porumb 30 g/l, K_2HPO_4 0.5 g/l, $MgSO_4$ 0.2 g/l, $FeSO_4$ 0.05 g/l, $CaCO_3$ 0.05 g/l.

Preinoculul este realizat prin inocularea mediului de cultură cu cultura bacteriană cu o rată de inoculare de 1% obținută în mediul de Nutrient, incubată timp de 24 h la 28 °C și 200 rpm.

Mediile de cultură pentru obținerea preinoculului și inoculantului sunt sterilizate la 121° C 25 min, cu valoarea pH ului de 7,1. Densitatea celulară a preinocului și inoculantului este determinat prin diseminare pe plăci agarizate de Nutrient la 14 h și 24 h.

Densitatea celulară a tulpinii bacteriene biostimulante de *Pseudomonas jessenii* T11 NCAIM P(B)001394 este 2×10^9 sejt/ ml unități formatoare de celule/ ml în preinocul după fermentare de 24 h.

Mediul de cultură a inoculantului este sterilizat la 25 min 121° C, și inoculat cu preinoculul cu rata de inoculare 0,5 %, incubat la 28 °C 24 h la 200 rpm.

Densitatea celulară a tulpinei *Pseudomonas jessenii* T11 NCAIM P(B)001394 este determinată prin diseminare pe plăci agarizate după 14 h și 24 h, care după 24 h de fermentație a atins valoarea de $4,6 \times 10^9$ UFC/ ml, iar pH ul este de $8,2 \pm 8,3$.

În cazul tulpinei bacteriene antagoniste de *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 fermentația industrială a fost realizată tot în mediu de cultură industrială.

Tulpina bacteriană a fost crescută în mediu nutritiv agarizat (Nutrient agar), timp de 24 ore, la 28° C, după care a fost realizată o suspensie de bază, folosind soluție fiziologică sterilă. Numărul celulelor din această suspensie a fost setată la 10^8 unități formatoare de colonii – UFC/ml

Suspensia bacteriană astfel obținută a fost folosită pentru inocularea unui volum de 20 ml de mediu nutritiv industrială. Cultura a fost crescută, timp de 24 ore, la 28 °C , cu agitare la 250 RPM.

Mediul nutritiv industrial conține următoarele substanțe: făină de soia 25 g, K_2HPO_4 1.25 g, zaharoză 1.25 g, apă distilată 1000 ml, sterilizat la 121 °C, 20 minute.

Cultura astfel obținută a fost folosit în continuare, pentru inocularea unui volum de 1 l de mediu nutritiv industrial (12.5 ml la 1 l de mediu). Cultura a fost crescută la 28° C, cu agitare de 200 RPM timp de 24 ore.

Densitatea celulară a tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 a atins 10^{10} de unități formatoare de colonii CFU/ml după 24 ore de fermentare valoarea pH -ului fiind 7.3.

Faza 9. Biotestarea in vitro a efectului benefic asupra plantelor de grâu

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 litru de sol, acestea fiind sterilizate prin autoclavare la 105°C timp și 30 de minute, repetate de trei ori în trei zile consecutive.

În cutii au fost însămânțate semințe de grâu germinate, și la baza fiecărei plântuțe s-a adăugat 1 ml de inoculant bacterian (10^8 UFC/ml/plantă).

Plantele de grâu au fost crescute timp 3 săptămâni la 25°C, 70% de umiditate relativă, durata perioadei de iluminare fiind de 12 ore/zi cu 2500 lx (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, respectiv lungimea tulpinii.

Consoția bacteriană a avut efect benefic asupra creșterii și dezvoltării plantelor de grâu, a stimulat vizibil creșterea greutateii totale a plantelor (fig. 1).

REVENDICARI

1. Biopreparat microbial mixt compus din trei tulpini bacteriene caracterizat prin aceea ca este compus din trei tulpini bacteriene *Delftia lacustris* 6BS, *Serratia fonticola* B17, *Pseudomonas jessenii* T11 sunt depuse la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta cu numere de depozit NCAIM P(B)001396, NCAIM P(B)001399 și NCAIM P(B)001394 ,avand capacitatea de a promova cresterea plantelor prin mobilizarea nutrientilor , producerea de fitohormoni si realizarea protectiei plantelor prin antagonism direct si indirect impotriva agentilor fitopatogeni .

1.1 Conform revendicarii 1 tulpina *Delftia lacustris* 6BS caracterizat prin aceea ca are capacitate de a solubiliza fosforul si azotul din materialele organice .

1.2 Conform revendicarii1 tulpina *Serratia fonticola* B17 caracterizat prin aceea ca produce ca metabolit secundar cianura de hidrogen si prezinta antagonism impotriva ciupercilor fitopatogeni *Fusarium oxysporum* si *Alternaria alternata*

1.3 Conform revendicarii1 tulpina *Pseudomonas jessenii* caracterizat prin aceea ca solubilizeaza fosfatii anorganici si produce fitohormon auxinic.

2. Procedeu de obtinere a unui produs biologic activ cu efect benefic complex cu rol de caracterizat prin aceea ca aceasta cuprinde obtinerea unui inocul, prin cultivarea tulpinii *Delftia lacustris* 6BS pe medii care contin melasa ca sursa de carbon, extract de porumb, sulfat de amoniu ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h, a tulpinii *Serratia fonticola* B17 pe medii care contin zaharoza ca sursa de carbon, faina de soia ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare și a tulpinii *Pseudomonas jessenii* T11 care contin melasa ca sursa de carbon, extract de porumb ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h , amestecarea celor trei biomase obtinute in raport gravimetric de 1:1:1, care se aplica pe samanta sau plantula sau sol.

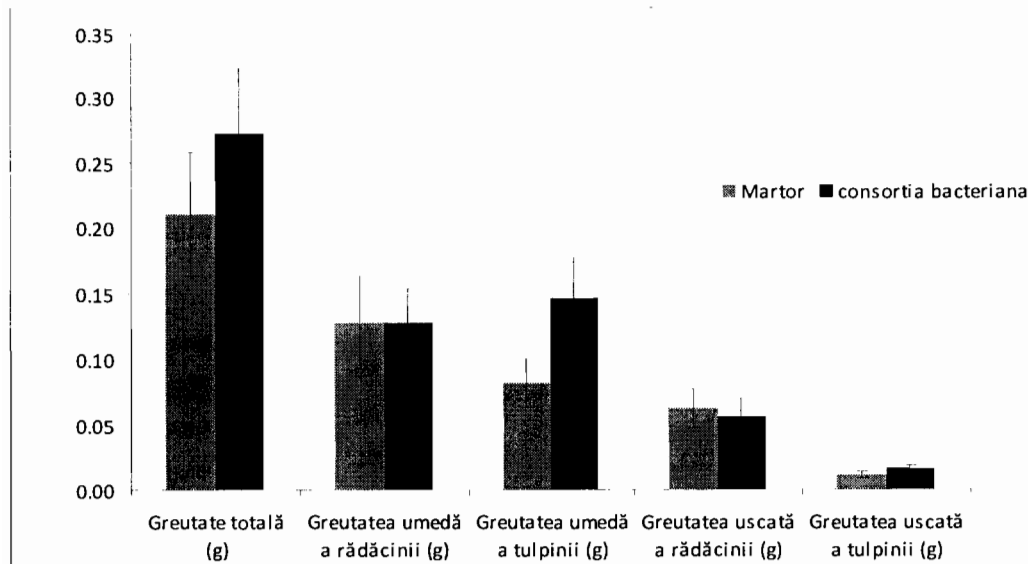


Figura 1. Efectul inoculării a consorției bacteriene asupra parametrilor biometrici față de proba martor în cazul plantelor de grâu