



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00928

(22) Data de depozit: 27/11/2015

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. 5/2017

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

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR. 5,
BL. D 7, SC. E, ET. 2, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MARA GYONGYVER, PIAȚA LIBERTĂȚII
NR. 10, SC. C, AP. 35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR. 12, BL. 4,
SC. 1, ET. 4, AP. 54, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• BECZE ANNAMARIA,
STR. PICTOR NAGY ISTVAN 8/A/20,
MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• MATHE LORAND, NR. 1054,
SÂNDOMIC, SM, RO;
• VARGA ORSOLYA, STR. LUMINII NR. 7,
DITRAU, HR, RO;
• BARTOS HUNOR, STR. PRIMĂVERII 3/A,
VLAHITA, HR, RO;
• PETER TUNDE, STR. CERBULUI NR. 1,
VLAHITA, HR, RO;
• LASLO EVA, BD. FRĂȚIEI NR. 2, SC. E,
AP. 18, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• LANYI SZABOLCS,
STR. MIHAI EMINESCU NR. 1, SC. A,
AP. 22, MIERCUREA CIUC, HR, RO

(54) BIOPREPARAT GRANULAR MIXT, PENTRU TRATAMENTUL
RESTURILOR VEGETALE ÎN SISTEMLILE DE AGRICULTURĂ
CONSERVATIVĂ, ȘI PROCEDU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biopreparat granular mixt, pentru tratamentul resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Biopreparatul conform invenției este constituit, în părți masice, din 40 părți făină de orz, 19,2 părți esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță, 16 părți alcool polivinilic, 12 părți lecitină, 3 părți oleat de

potasiu, 1,6 părți glicerol, respectiv, trigliceride, alginat de calciu, 0,4 părți carboximetilceluloză, 2 părți kefir, apă reziduală și cel puțin 10^7 ufc/g *Bacillus sp* și 10^7 *Lactobacillus plantarum*.

Revendicări: 5
Figuri: 1



BIOPREPARAT GRANULAR MIXT PENTRU TRATAMENTUL RESTURILOR VEGETALE ÎN SISTEMELE DE AGRICULTURĂ CONSERVATIVĂ ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la un biopreparat granular mixt, realizat pe baza unor tulpini de bacterii biostimulante pentru plante, și destinat tratamentului resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă.

Sunt cunoscute diferite tipuri de biopreparate destinate tratamentului resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă. Aceste sisteme de agricultură conservativă se caracterizează nu numai prin reducerea lucrărilor solului, ci și prin menținerea solului acoperit cu resturi vegetale. În timpul vegetației culturilor principale acoperirea este asigurată de resturile vegetale rezultate din culturile premergătoare, care sunt lăsate fixate sau tocate după recoltare, și/sau dintr-o cultură de acoperire în timpul iernii, transformată în mulci înainte de însămânțarea culturii principale, și/sau prin mulcirea cu materiale vegetale (Hobbs et al. 2008, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363:543-555.). Resturile vegetale care acoperă solul limitează evaporarea apei, facilitează infiltrarea precipitațiilor, reduc eroziune, ameliorează structura solului, cresc conținutul de materie organică și de carbon, și moderează temperatura solului în zonele calde (Scopel et al. 2013, *Agronomy for Sustainable Development*, 33:113-130).

În afara numeroaselor avantaje sunt și o serie de efecte negative asociate sistemelor cu nivel ridicat de resturi vegetale pe sol. Resturile de plante favorizează dezvoltarea agenților fitopatogeni din sol (Bockus și Shroyer, 1998, *Annual Review of Phytopathology*, 36:, 485-500), inclusiv a celor devastanți, cum sunt de exemplu cei care produc fuzarioza spicului (Guo et al. 2010, *Plant Pathology*, 59: 1107-1113). Nivelele ridicate de resturi vegetale pot reduce disponibilitatea azotului pentru culturile principale în stadiile inițiale de dezvoltare (Geisseler et al. 2010, *Soil Biology and Biochemistry*, 42:2058-2067). Resturile vegetale au efecte nefavorabile asupra înființării culturii și dezvoltării ei în primele faze de vegetație datorită reducerii temperaturii solului (Morris et al. 2009, *European Journal of Agronomy*, 30: 151-162).

Brevetul RO 127514 B1 se referă la o tulpină de *Bacillus subtilis* Usa2, număr de depozit DSMZ 23654, utilizată pentru combaterea agenților patogeni din sol, stimularea creșterii plantelor și biodegradarea controlată a materialului vegetal din cadrul sistemelor

de agricultură conservativă. Această tulpină bacteriană exercită acțiuni benefice asupra plantelor de cultură, datorită activității de protecție față de ciuperci fitopatogene de sol *Fusarium graminearum*, *Alternaria* spp, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytium debaryanum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*, a producerii *in situ* de factori de creștere pentru plante și a capacității de degradare controlată a materialului vegetal, cu formare de poliamine, compuși care cresc rezistența plantelor la stresurile biotice și abiotice. Aceste acțiuni benefice se concretizează prin sporuri de producție la floarea-soarelui, realizate în condițiile unui sistem agricol conservativ, în care sunt reduse costurile de producție aferente folosirii erbicidelor și arăturii.

Brevetul RO 127471 descrie o tulpină de *Trichoderma pseudokoningii* Td85, depozitată cu numărul DSM 23661, care este destinată sistemelor de agricultură conservativă, având un spectru larg de acțiune, inclusiv față de patogeni de sol din genurile *Fusarium*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, și față de cei producători de putregaiuri ca *Botrytis*, și prezentând o capacitate ridicată de mineralizare a materialului vegetal, cu eliberare de nutrienți și compuși biologic activi. Această tulpină are o rezistență naturală ridicată la compuși biofumiganti, eliberați din biomasa de crucifere provenită din culturi de toamnă, și determină creșteri de producție la soia cultivată în sistem conservativ, prin aplicare pe mulciul din resturi vegetale cu care s-a realizat biofumigarea.

Un dezavantaj al biopreparatelor realizate prin utilizarea unei singure tulpini este dat de spectrul de acțiune limitat. Este foarte dificil de izolat și identificat o tulpină care să prezinte concomitent atât caracteristici de antagonism pentru agenții fitopatogeni care se dezvoltă pe resturile vegetale, cât și caracteristici de stimulare a creșterii plantelor, inclusiv datorită producerii de compuși biostimulanți prin degradarea materialului vegetal. Din acest motiv au fost propuse o serie de biopreparate mixte. Brevetul EP 0720974 B1 prezintă complexe bacteriene și aplicarea lor la tratamentul resturilor de origine biologică. Complexele bacteriene includ specii din genul *Bacillus*, selectate din grupul reprezentat de tulpini din speciile *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, și *Bacillus circulans*, și cel puțin o tulpină nepatogenă de *Lactobacillus*, selectată din grupul reprezentat de tulpini din speciile *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, și *Lactobacillus acidophilus*.

Cererea de brevet 20140318201 A1 revendică un procedeu de transformare a resturilor vegetale în biofertilizanți care implică punerea în contact a respectivelor resturi vegetale cu cel puțin 3 tipuri diferite de specii de microorganisme, din genurile *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*.

Brevetul RO protejează o compoziție de biopreparat mixt, pentru tratamentul resturilor vegetale în vederea combaterii biologice a ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*, alcătuită din 1...20% suspensie concentrată de microorganisme antagonice, constând din *Saccharomyces cerevisiae* L30 (număr depozit NCAIM Y001350) și *Bacillus subtilis* B49b (număr depozit NCAIM B001360), preferabil între 4 și 8% din fiecare dintre cele două componente biologice, 2...15% nutrienți, 5...15% amestec de surfactanți anionici și neionici, 10...50% un solvent ecologic, 0, 01...1% un stabilizator, 1...10% un anticoagulant, și până la 100% apă distilată.

Cererea de CN104671851 A dezvăluie un biopreparat mixt destinat transformării resturilor vegetale de tulei de porumb într-un biofertilizant, care este alcătuit din tulpini de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mucilaginosus*, *Lactobacillus plantarum* și drojdii.

Nu s-au descris până în prezent biopreparate mixte destinate tratamentului resturilor vegetale care acoperă solul în sistemele de agricultură conservativă care să prezinte concomitent activitate antagonistă pentru agenți fitopatogeni care se dezvoltă pe respectivele resturi vegetale și care să producă compuși beneficiu, biostimulatori pentru plantele de cultură.

Un alt dezavantaj al compozițiilor de biopreparate mixte descrise până în prezent pentru tratamentul resturilor vegetale este determinat de faptul că acestea nu asigură menținerea unei activități a apei în substratul format din respectivele resturi vegetale, care să permită activitatea microorganismelor / bacteriilor. Activitatea apei din resturile vegetale care acoperă solul este esențială pentru dezvoltarea microorganismelor (Manstretta și Rossi, 2015, *Agricultural and Forest Meteorology*, 207: 83-93), iar cele mai xero-tolerante bacterii nu pot crește sub o limită a activității apei de 0,7 (Stevenson et al 2015, *ISME Journal* 9: 1333–135).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un biopreparat mixt destinat tratamentului resturilor vegetale, care să prezinte concomitent antagonism pentru agenți fitopatogeni și producere de compuși biostimulatori și care să asigure



menținerea unui nivel al activității apei după aplicare în respectivele resturi vegetale, optim pentru dezvoltarea bacteriilor și exprimarea caracteristicilor lor benefice.

Biopreparatul granular mixt conform invenției este alcătuit din: făina de orz 40 părți; esterii etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță 19,2 părți; alcool polivinilic 16 părți, lecitina 12 părți; oleat de potasiu 3 părți; glicerol 1,6 părți; trigliceride 1,6 părți; alginat de calciu 1,6 părți; carboximetilceluloză 0,4 părți; kefiran 2 părți, apă reziduală până la 100 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă, și cel puțin 10^7 ufc/g *Bacillus sp.* și 10^7 ufc/g *Lactobacillus plantarum*.

Tulpinile de *Bacillus sp.* utilizate pentru compoziția de biopreparat granular mixt sunt *B. licheniformis* SZE102A, număr de depozit NCAIM P (B)001437 sau *B. subtilis* SZX102, număr de depozit NCAIM P (B)001438, care au antagonism față de agenții fitopatogeni și capacitate de degradare a materialului vegetal și sunt compatibile cu lactobacilii.

Tulpina de *Lactobacillus plantarum* utilizată pentru biopreparatul granular mixt este tulpina cu numărul de depozit NCAIM (P) B001436, care are capacitatea de a produce compuși care stimulează creșterea plantelor.

Biopreparatul granular mixt conform invenției se obține prin următorul procedeu:

- Se realizează o suspensie care conține 5×10^9 ufc/ml bacterii *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436, într-o soluție de 1% carboximetilceluloză 100 cP 1% și 0,25M clorură de calciu;
- Se gelifiează ionotropic suspensia de lactobacili prin picurare într-o soluție de alginat de sodiu, obținută prin dizolvarea a 17,6 g acid alginic în 1000 ml soluție bicarbonat de sodiu 1 M;
- Se recuperează granulele formate după menținere timp de 30-35 minute pentru întărire, și se usucă la maxim 40°C, și se macină granulele într-o moară cu cuțit bătător, obținându-se un produs care conține min. 5×10^8 ufc/g bacterii *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436;
- În paralel se co-cultivă tulpinile de *Bacillus*, *B. licheniformis* SZE102A, NCAIM B001437 sau *B. subtilis* SZX102, NCAIM B001438, împreună cu tulpina *L. plantarum* NCAIM B001436, pe un mediu care favorizează formarea granulelor de kefiran, aerat până la 10% saturație de oxigen, timp de 96 ore, la 28°C și pH 6.0;
- Se separă granulele de kefiran din mediul lichid, se omogenizează la un turbo-mixer și se usucă prin pulverizare în condiții blânde, la o temperatură de 120 ... 140°C

intrare agent de uscare și 70 ... 75°C ieșire agent de uscare, obținându-se un produs care conține min. 5×10^8 ufc/g bacterii benefice din genul *Bacillus*;

- Pulberea rezultată prin măcinarea granulelor cu *L. plantarum* NCAIM B001436 și pulberea rezultată prin uscarea granulelor de kefir cu bacterii benefice din genul *Bacillus*, *B. licheniformis* SZE102A, NCAIM B001437 sau *B. subtilis* SZX102, NCAIM B001438 se omogenizează în raport de 1:1, iar 4 părți din pulberea rezultat se amestecă cu o compoziție alcătuit din: făina de orz 40 părți; esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță 19,2 părți; alcool polivinilic 16 părți, lecitina 12 părți; oleat de potasiu 3 părți; glicerol 1,6 părți; trigliceride 1,6 părți;

- Amestecul păstos rezultat se extrudează pe o mașină de făcut paste, tăiței rezultati sunt granulați pe un echipament de sferonizare, iar granulele rezultate sunt uscate într-un uscător în pat fluid, la o temperatură maximă de 37°C.

Mediul care favorizează formarea granulelor de kefiran este un mediu lichid format din 2% lactoză, 2,5% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 0,4% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,02% Zn : glicerol (1:4) 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Include bacterii benefice din genul *Bacillus* care sunt antagoniste față de agenții fitopatogeni și cu capacitate de degradare a materialului vegetal, și bacterii benefice *Lactobacillus plantarum*, care produc compuși cu activitate de stimularea a creșterii plantelor;
- ✓ Asigură o bună fixare de suprafață materialului vegetal, sub acțiunea aderentă conjugată a alcoolului polivinilic și a kefiranului;
- ✓ Asigură menținerea unei activități ridicate a apei în substratul tratat, datorită acțiunii hidrogelifiante a alcoolului polivinilic, alginatului de calciu și kefiranului și acțiunii umectante a lecitinei și a oleatului de potasiu.

În continuare se prezintă exemple de realizare a invenției, care o ilustrează fără a o limita, în relație și cu figura 1.

Figura 1. Ilustrarea procedurii de obținere a biopreparatului granular mixt.

Exemplu 1. Se realizează o suspensie care conține 5×10^9 ufc/ml bacterii *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436, într-o soluție de 1% carboximetilceluloză 100

cP 1% și 0,25 M clorură de calciu. Bacteriile se obțin conform unor procedee cunoscute, de exemplu prin cultivare timp de 24-48 ore pe mediu lichid selectiv lichid MRS cu următoarea formulă (g/l): extract enzimatic de țesut animal 10; extract de carne 10; extract de drojdie 5; glucoză 20; acetat de sodiu 1; Polysorbate 80 1; K₂HPO₄ 2; citrat di-amoniacal 2; MgSO₄ 0,1g; MnSO₄ – 0,05, urmată de separarea bacteriilor prin centrifugare și resuspendare normalizată prin determinarea densității optice.

Tulpina bacteriană lactică *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436 a fost izolată dintr-un produs fermentat tradițional de tip cașcaval, pe mediu nutritiv selectiv MRS. Tulpina are o capacitate ridicată de a produce acid lactic și acid acetic din diferite substraturi / medii. A fost testată capacitatea acestei tulpini de a produce acid lactic și acid acetic din diferite surse de carbon - glucoză, glucoză și xiloză și borhot de porumb cu solubilele de distilerie uscate (DGGS - *dried distillers grains with solubles*). Concentrația acidului lactic și acetic din respectivele medii a fost determinată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță, HPLC, folosind un aparat Varian Pro Star 210 echipat cu coloană Coregel-87H3 (Transgenomic). Ca fază mobilă s-a utilizat o soluție de H₂SO₄ în concentrație de 0,008 M cu un debit de 0,6 ml/min, temperatura coloanei fiind de 50°C. Determinarea concentrațiilor acizilor s-a realizat prin utilizarea unei curbă de calibrare. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tab. 1. Concentrația acidului lactic și acidului acetic rezultat din procesul de fermentație al tulpinii *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436 pe diferite substraturi.

Concentrație acid mediu de fermentație	Timpul de fermentație, ore				
	24	36	48	60	72
Sursa de carbon utilizat: glucoza					
Acid lactic g/l	25,529	26,420	26,910	37,364	39,092
Acid acetic g/l	1,893	1,974	1,926	2,274	7,839
Sursa de carbon utilizat: glucoza și xiloza					
Acid lactic g/l	28,215	20,2995	28,1565	22,32	28,098
Acid acetic g/l	2,037	3,267	3,339	1,77	3,999
Sursa de carbon utilizat: DGGS					
Acid lactic g/l	4,464	5,202	6,9255	4,5945	5,8005
Acid acetic g/l	1,761	3,48	1,995	3,267	2,097

Acidul lactic și acidul acetic determină stimularea creșterii plantelor (Yoshikawa et al. 1993, *Canadian Journal of Microbiology*, 39: 1150-1154), inclusiv datorită solubilizării / biodisponibilizării fosforului din sol (Rodríguez și Fraga, 1999, *Biotechnology Advances*, 17: 319-339).

Identificarea tulpinii bacteriene ca fiind *Lactobacillus plantarum* s-a realizat pe baza secvențializării fragmentului 16r ADN. Pentru izolarea ADN-ului bacterian s-a utilizat un kit de extracție (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit) iar amplificarea genei 16S ribozomal prin tehnica PCR s-a realizat cu 2 amorse de procariote: 27 f și 1492 r. 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). Rezultatele sunt prezentate în tab. 2, și dovedesc o similaritate de 100% cu tulpina tip de *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum* ATCC 14917.

Tab.2. Încadrarea taxonomică a tulpinii de lactobacil pe baza secvenței 16S rADN.

Tulpina	Lungimea secvență analizată	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificare tulpină - procentul de similaritate secvență 16S rADN
Lacto-bacil	867 pb (perechi de baze)	TGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAA ACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTAC GGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT TTGCTACCCATACTTTTCGAGCCTCAGCGTC AGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCA CTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTCA CCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTT CTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCA CTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACAT CAGACTTAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTT ACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCC ACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGC TAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACC GTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATAT GTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGC CGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTG CTCCATCAGACTTTTCGTCCATTGTGGAAGA TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTG GGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT TACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGC CATGGTGAGCCGTTACCCACCATCTAGCT AATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGAT AGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCAT GCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCAT CTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGG GCAGGTTTCCACGTGTTACTCACCAGTTC GCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCA AGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGAC TTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTT CGTC	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917(T) 100%

Tulpina de *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* a fost depozitată la Autoritatea de Depozit Internațională National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numărul de înregistrare NCAIM (P) B001436.

Se aduc 1000 ml soluție bicarbonat de sodiu 1 M peste 17,6 g acid alginic și se solubilizează acidul alginic prin formarea de alginat de sodiu și eliberare de bioxid de carbon. În soluția astfel rezultată se gelifiează ionotropic suspensia de lactobacili prin picurare printr-un ac bont, la o rată constantă de 0,25 ml/min. Această picurare este realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml (Harvard Apparatus sau KD Scientific). Granulele sferice formate prin coagularea suspensiei de lactobacili – carboximetilceluloză – clorură de calciu în soluție de alginat se mențin timp de 30... 35 min, pentru întărire. Se recuperează granulele formate și se usucă la maxim 40°C. Granulele uscate se macină granulele într-o moară cu cuțit bătător, obținându-se un produs pulverulent care conține min. 5×10^8 ufc/g bacterii *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436.

În paralel se co-cultivă tulpinile de *Bacillus*, *B. licheniformis* SZE102A, NCAIM B001437 sau *B. subtilis* SZX102, NCAIM B001438, împreună cu tulpina *L. plantarum* NCAIM B001436, pe un mediu care favorizează formarea granulelor de kefir, aerat până la 10% saturație de oxigen, timp de 96 ore, la 28°C și pH 6.0.

Într-un bioreactor (Biostat® B, Goettingen, Germania), prevăzut cu senzor de pH și senzor de oxigen dizolvat (DO) (InPro6800; Mettler-Toledo AG, Greifensee, Elveția), prevăzut cu un vas de 5 litri, se aduc 2 litri mediu lichid, format din (m/v): 2% lactoză, 2,5% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 0,4% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,02% Zn : glicerol (1:4) 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Mediul se sterilizează, se răcește la temperatura de 28°C și se inoculează cu câte 10 ml 1×10^8 ufc, de suspensii de tulpini compatibile, producătoare de consorții de consens, de *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436 și tulpina de microorganism benefic plantelor, *B. licheniformis* SZE102A, NCAIM B001437.

Complexul Zn / glicerol utilizat este preparat după cum urmează: 30 g de acetat de zinc hidratat, $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ și 52 g de glicerol (4 echivalenți) sunt încălzite într-un balon cu fundul plat de 500 ml la 120°C pe baie de ulei (110°C temperatura internă).

Amestecul este agitat mecanic cu un turbomixer cu cuțit de inox. După menținere trei ore la 120°C amestecul este răcit și centrifugat la 4500 rpm pentru 30 minute. Supernatantul clar este înlăturat, iar sedimentul alb este reluat în iso-propanol și resuspendat. În final se aduce la 100 ml cu i-propanol, se filtrează prin pâlnie de sticlă sinterizată și se readuce din nou la cota de 100 ml. Soluția rezultată se evaporă la sec, iar reziduul este reluat cantitativ și cântărit.

Izolarea tulpinii bacteriene SZE102A s-a realizat din produs fermentat, siloz de iarbă cosită, pe mediu nutritiv-screening (compoziția mediului în gram/litru: gelatină 2.0; celuloză 2.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, KH_2PO_4 0.5; roșu de Congo 0.2; agar 15.0. pH final 7.0 +/- 0.2 la 25°C). Tulpina SZE102A are capacitatea de a crește pe medii cu xilan și celuloză ca unică sursă de carbon și prezintă caracteristici de antagonism față de agenți fitopatogeni. Evidențierea efectului antagonistic al tulpinii SZE102A asupra fungilor fitopatogeni s-a determinat *in vitro* folosind metoda culturii duble. Plăcile Petri au fost însămânțate prin striere cu 100 μ l de suspensie bacteriană ($OD_{600}=0.3$), urmat de plasarea unor discuri prelevate din gazon de fungi fitopatogeni ($\varnothing$ 7 mm) la o distanță de 4 cm de cultura bacteriană. mediul de cultură utilizat a fost mediul Complex (peptonă 10 g, glucoză 40 g, extract de drojdie 10 g, agar 20 g, apă distilată 1000 ml). Plăcile Petri inoculate numai cu fungi au fost folosite ca martor de dezvoltare a coloniei. Plăcile au fost incubate la $28 \pm 2^\circ C$ pentru 5-7 zile. După 5-7 zile s-a efectuat analiza de inhibare a dezvoltării fungilor fitopatogeni de către bacterii. Testul de antagonism al izolatului SZE102A față de fungii fitopatogeni a fost repetat de 3 ori. Rezultatul obținut a fost transformat în rată de inhibiție a creșterii biomasei fungice folosind ecuația: Rata de inhibiție (%) = $[(1 - (\text{diametrul coloniei fungice formate în prezența bacteriei} / \text{diametrul probei control})) \times 100$. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.

Tab. 3. Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Bacillus* SZE102A asupra creșterii miceliene a unor fungi fitopatogeni.

Agent fitopatogen	% inhibiție indusă de tulpina SZE102A
<i>Fusarium graminearum</i>	95,82
<i>Botrytis allii</i>	100
<i>Rhizoctonia solani</i>	100
<i>Phytium ultimum</i>	90,46
<i>Macrophomina phaseolina</i>	100

<i>Verticillium dahliae</i>	82,82
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100

Identificarea tulpinii bacteriene SZE102A ca fiind *Bacillus licheniformis* s-a realizat pe baza secvențializării fragmentului 16r ADN. Pentru izolarea ADN-ului bacterian s-a utilizat un kit de extracție (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit) iar amplificarea genei 16S ribozomal prin tehnica PCR s-a realizat cu 2 amorse de procariote: 27 f și 1492 r. 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). Rezultatele sunt prezentate în tab. 4, și dovedesc o similaritate de 99,65% cu tulpina *Bacillus licheniformis* AE 017333.

Tab.4. Încadrarea taxonomică a tulpinii bacteriene SZE102A pe baza secvenței 16S rADN.

Tulpina	Lungimea secvență analizată	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificare tulpină - procentul de similaritate secvență 16S rADN
SZE102A	858 pb (perechi de baze)	GCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCA CTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGC ACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG GTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTT CGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAG AGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACA TCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAA TTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCC CCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAG CCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAAC CGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATT CCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACC GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC TTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGC CCTATTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAA CAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCA TCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACT TTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCT GCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTC AGTCCCAGTGTTGCCGATCACCTCTCAG GTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGC CGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGC GGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGC CACCTTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAA TCAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCC GGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTAC CCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTGA CCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCGGTCCGC TCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA GCG	<i>Bacillus licheniformis</i> AE017333 99.65%

Tulpina SZE102A de *Bacillus licheniformis* a fost depozitată la Autoritatea de Depozit Internațională National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numărul de înregistrare NCAIM (P) B001437.

Consoțul de microorganisme compatibile, de *Lactobacillus plantarum* NCAIM (P) B001436, producătoare de kefir / polizaharide și *Bacillus licheniformis* SZE102A, NCAIM (P) B001437, se cultivă timp de 96 ore, la 10% saturație de oxigen, la 28°C și pH 6.0. Se separă prin centrifugare la 8000 g granulele de kefir, formate în cantitate de cel puțin 4 g/l, care apoi se omogenizează la un turbo-mixer. Suspensia rezultată se usucă prin pulverizare în condiții blânde, la o temperatură de 120 ... 140°C intrare agent de uscare și 70 ... 75°C ieșire agent de uscare, obținându-se un produs care conține min. 5×10^8 ufc/g bacterii benefice plantelor *Bacillus licheniformis* SZE102A.

Pulberea rezultată prin măcinarea granulelor cu *L. plantarum* NCAIM B001436 și pulberea rezultată prin uscarea granulelor de kefir cu bacterii benefice *B. licheniformis* SZE102A, NCAIM B001437, se omogenizează în raport de 1:1, iar 4 părți din pulberea rezultată se amestecă cu o compoziție alcătuit din: făina de orz 40 părți; esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță 19,2 părți; alcool polivinilic 16 părți; lecitina 12 părți; oleat de potasiu 3 părți; glicerol 1,6 părți; trigliceride 1,6 părți.

Pasta rezultată a fost extrudată pe o mașină de făcut paste, (Model TR95A, Helco, Craiova, România), iar tăieții rezultați au fost granulați pe un echipament de sferonizare (model Spheronis R-250m Grabler, Ettlingen, Germania). Granulele rezultate au fost uscate într-un uscător în pat fluid (Model TC20, Rensch, Germania), la o temperatură maximă de 37°C.

Amestecul de esteri etilici ai acizilor grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină, lipide nesaponificabile din ulei de rapiță s-a obținut conform procedurii descris în continuare. 1000 g de ulei degumat de rapiță, cu caracteristicile prezentate în tabelul 5 a fost adus într-o autoclavă de 2 litri din oțel inox, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare de azot.

Tab. 5. Caracteristicile uleiului degumat de rapiță folosit

Apă și compuși volatili	% m/m	0,4
Substanțe nesaponificabile	% m/m	1,4
Acizi grași liberi	% m/m	1,9
Index de saponificare	mg KOH/g	169,5

Compoziția medie în acizi grași (% w/w): C16: 2.4; C18: 1.2 ; C18-1: 16.1; C18-2: 24.5; C18-3: 7.3; C20-1: 7.3; C22-1: 42.4

S-au dizolvat 25 g de hidroxid de potasiu de puritate 98% în 210 g de etanol cu 0,3% apă, iar soluția rezultată a fost adăugată în autoclav peste uleiul degumat de rapiță. Se pornește agitarea și încălzirea la 40°C. După un timp de reacție de 8 ore, masa de reacție s-a răcit la temperatura camerei. S-au colectat 1225 g de masă transparentă de reacție (R1). 500 g de produs P1 s-a tratat cu acid oleic tehnic, obținându-se un produs cu următoarea compoziție: (% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 74,5; trigliceride 5,9; glicerol 7,1; săpun de potasiu 11,4 și apă 1,1. 140 g din produsul de reacție (P1) a tratat prin agitare viguroasă cu 60 g emulsifiant lecitină de soia lichidă obținându-se un amestec cu compoziția cu următoarea compoziție: (% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 48,7; grăsimi nereacționate din ulei de rapiță 4; glicerol 4,5; săpun de potasiu 7,5, lecitină 34,6 și apă 0,7. Acest

Lecitina de soia folosită în amestecul de mai sus este o lecitină cu o balanță hidrofil - lipofilă HLB de 4, Yelikin®, Archer Daniels Midland, Decatur, IL, SUA, dar orice alt tip de lecitină cu aceleași caracteristici poate fi folosită.

Alcoolul polivinilic folosit este APV 26-88, pulbere EMPROVE®, Merck, Darmstadt, Germania, dar orice alt tip de alcool polivinilic cu aceleași caracteristici poate fi folosit.

Biopreparatul granular mixt rezultat în urma aplicării exemplului de mai sus este alcătuit din: făina de orz 40 părți; esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță 19,2 părți; alcool polivinilic 16 părți, lecitina 12 părți; oleat de potasiu 3 părți; glicerol 1,6 părți; trigliceride 1,6 părți; alginat de calciu 1,6 părți; carboximetilceluloză 0,4 părți; kefiran 2 părți, apă reziduală până la 100 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă, și cel puțin 10^7 ufc/g *Bacillus licheniformis* SZE102A NCAIM B001437 și 10^7 ufc/g *L. plantarum* NCAIM B001436.

Exemplu 2. Se procedează ca în exemplu 1, numai că se folosește tulpină de *Bacillus subtilis* SX102. Izolarea tulpinii bacteriene SX102 s-a realizat din produs fermentat, siloz de iarbă cosită, pe mediu nutritiv-screening (compoziția mediului în gram/litru: gelatină 2.0; celuloză 2.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, KH_2PO_4 0.5; roșu de Congo 0.2; agar 15.0. pH final 7.0 +/- 0.2 la 25°C).

Tulpina SX102 are capacitatea de a crește pe medii cu xilan și celuloză ca unică sursă de carbon, prezintă caracteristici de antagonism față de agenți fitopatogeni și este compatibilă cu lactobacteriile, inclusiv cu tulpina *L. plantarum* NCAIM B001436.

Tulpina bacteriană *Bacillus* sp. SX102 a fost testată în vederea determinării utilizării carbohidraților structurali din materialul vegetal (celuloză, xilan). Pentru creșterea tulpinii bacteriene a fost folosit mediu lichid BHM, conținând ca unică sursă de carbon celuloză sau xilan. Mediul lichid BHM folosit a avut următoarea compoziție: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; CaCl_2 0,02 g/l, KH_2PO_4 1.0 g/l, NH_4NO_3 1.0 g/l și FeCl_3 0,05 g/l. Acest mediu minimal a fost suplimentat cu celuloză sau xilan în cantitate de 5 g/l, pentru a obține medii în care unica sursă de carbon și energie era reprezentată de celuloză sau de xilan. Mediile lichide BHM cu celuloză sau xilan au fost repartizate în vase Erlenmayer (câte 50 ml în vase de 500 ml), prevăzute cu dop de vată, sterilizate la 121°C, răcite la temperatura camerei și inoculate cu culturi proaspete (cultivate peste noapte) în mediu Nutrient (glucoză, 1 g/l; peptonă, 15 g/l; NaCl, 6 g/l; extract drojdie, 3 g/l).

După inoculare vasele Erlenmeyer au fost incubate timp de 7 zile la 28°C și 150 rpm. În zilele 3, 5, și 7 s-au prelevat probe care au fost centrifugate la 10.000 g pentru separarea bacteriilor. În supernatant au fost determinate zaharurile reducătoare cu reactiv DNS. Rezultatele, prezentate în tabelul 6, demonstrează faptul că tulpina bacteriană *Bacillus* sp. SX102 este capabilă să crească și să utilizeze și celuloza și xilanul ca unică sursă de carbon.

Tab. 6. Capacitatea tulpinii *Bacillus* sp. SX102 de a crește și de a utiliza celuloza și xilanul ca unică sursă de carbon.

Varianta experimentală	Variația OD540		
	3 zile	5 zile	7 zile
Mediu lichid BHM cu xilan	0	0.0359	0.3933
Mediu lichid BHM cu celuloză	0	0.0332	0

Identificarea tulpinii bacteriene SZE102A ca fiind *Bacillus licheniformis* s-a realizat pe baza secvențializării fragmentului 16r ADN. Pentru izolarea ADN-ului bacterian s-a utilizat un kit de extracție (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit),

conform specificațiilor de lucru indicate de producător. Amplificarea genei 16S ribozomal prin tehnica PCR s-a realizat cu 2 amorse special proiectate pentru organisme procariote: 27 f și 1492 r. 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).

Rezultatele sunt prezentate în tab. 7, și dovedesc o similaritate de 99,88% cu tulpina de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ABQL01000001.

Tab.4. Încadrarea taxonomică a tulpinii bacteriene SZE102A pe baza secvenței 16S rADN.

Tulpina	Lungimea secvență analizată	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificare tulpină - procentul de similaritate secvență 16S rADN
SZX102	853 pb (perechi de baze)	CGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGC ACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACT TAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACT ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCC CACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTAC AGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGG TGTTCTCCACATCTCTACGCATTTTAC CGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCT TCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAAT GACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTT TCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGC GAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGA CAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC TTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACC GCCCTATTGCAACGGTACTTGTTCTTCC CTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAA ACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCC GTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGAT TCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC GATCACCTCTCAGGTCCGGTACGCAT CGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACC AACTAGCTAATGCGCCGCGGTCCATC TGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTT ATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAC CATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGG AGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTA CCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCT AACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGT CCGCTCGACTTGATGTATTAGGCACG CCGCCA	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> ABQL01000001 99.88%

Evidențierea efectului antagonistic al tulpinii SZX102 asupra fungilor fitopatogeni s-a determinat in vitro folosind metoda culturii duble. Plăcile Petri au fost însămânțate prin striere cu 100 μ l de suspensie bacteriană ($OD_{600}=0.3$), urmat de plasarea unor discuri prelevate din gazon de fungi fitopatogeni ($\varnothing$ 7 mm) la o distanță de 4 cm de cultura bacteriană. mediul de cultură utilizat a fost mediul Complex (peptonă 10 g, glucoză 40 g, extract de drojdie 10 g, agar 20 g, apă distilată 1000 ml). Plăcile Petri inoculate numai cu fungi au fost folosite ca martor de dezvoltare a coloniei. Plăcile au fost incubate la $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pentru 5-7 zile. După 5-7 zile s-a efectuat analiza de inhibare a dezvoltării fungilor fitopatogeni de către bacterii. Testul de antagonism al izolatului SZX102 față de fungii fitopatogeni a fost repetat de 3 ori. Rezultatul obținut a fost transformat în rată de inhibiție a creșterii biomasei fungice folosind ecuația: Rata de inhibiție (%) = $[(1 - (\text{diametrul coloniei fungice formate în prezența bacteriei} / \text{diametrul probei control})) \times 100$. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 8.

Tab. 8. Testarea in vitro a activității antagoniste a tulpinii de *Bacillus* SZX102 asupra creșterii miceliene a unor fungi fitopatogeni.

Agent fitopatogen	% inhibiție indusă de tulpina SZX102
<i>Fusarium graminearum</i>	100
<i>Botrytis allii</i>	100
<i>Rhizoctonia solani</i>	100
<i>Phytium ultimum</i>	95,08
<i>Macrophomina phaseolina</i>	81,55
<i>Verticillium dahliae</i>	78,20
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100

Tulpina SZX102 de *Bacillus subtilis* a fost depozitată la Autoritatea de Depozit Internațională National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numărul de înregistrare NCAIM (P) B001438.

Revendicări

1. Biopreparat granular mixt conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din: făina de orz 40 părți; esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță 19,2 părți; alcool polivinilic 16 părți, lecitina 12 părți; oleat de potasiu 3 părți; glicerol 1,6 părți; trigliceride 1,6 părți; alginat de calciu 1,6 părți; carboximetilceluloză 0,4 părți; kefiran 2 părți, apă reziduală până la 100 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă, și cel puțin 10^7 ufc/g *Bacillus* sp. și 10^7 ufc/g *Lactobacillus plantarum*.
2. Biopreparat granular mixt conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** tulpinile de *Bacillus* sp. utilizate sunt *B. licheniformis* SZE102A, număr de depozit NCAIM P (B)001437 sau *B. subtilis* SZX102, număr de depozit NCAIM P (B)001438, care au antagonism față de agenții fitopatogeni și capacitate de degradare a materialului vegetal și sunt compatibile cu lactobacilii.
3. Biopreparat granular mixt conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** tulpina de *Lactobacillus plantarum* utilizată este tulpina cu numărul de depozit NCAIM (P) B001436, care are capacitatea de a produce compuși care stimulează creșterea plantelor.
4. Procedeu de obținere a biopreparatului granular mixt conform **invenției caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: se realizează o suspensie care conține 5×10^9 ufc/ml bacterii *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436, într-o soluție de 1% carboximetilceluloză 100 cP 1% și 0,25M clorură de calciu; se gelifiează ionotropic suspensia de lactobacili prin picurare într-o soluție de alginat de sodiu, obținută prin dizolvarea a 17,6 g acid alginic în 1000 ml soluție bicarbonat de sodiu 1 M; se recuperează granulele formate după menținere timp de 30-35 minute pentru întărire, și se usucă la maxim 40°C, și se macină granulele într-o moară cu cuțit bătător, obținându-se un produs care conține min. 5×10^8 ufc/g bacterii *Lactobacillus plantarum* NCAIM B001436; în paralel se co-cultivă tulpinile de *Bacillus*, *B. licheniformis* SZE102A, NCAIM B001437 sau *B. subtilis* SZX102, NCAIM B001438, împreună cu tulpina *L. plantarum* NCAIM B001436, pe un mediu care favorizează formarea granulelor de kefiran, aerat până la 10% saturație de oxigen, timp de 96 ore, la 28°C și pH 6.0; se separă granulele de kefiran din mediul lichid, se omogenizează la un turbo-mixer și se usucă prin pulverizare în condiții blânde, la o temperatură de 120 ... 140°C intrare agent de uscare și 70 ... 75°C ieșire agent de uscare, obținându-se un produs

care conține min. 5×10^8 ufc/g bacterii benefice din genul *Bacillus*; pulberea rezultată prin măcinarea granulelor cu *L. plantarum* NCAIM B001436 și pulberea rezultată prin uscarea granulelor de kefir cu bacterii benefice din genul *Bacillus*, *B. licheniformis* SZE102A, NCAIM B001437 sau *B. subtilis* SZX102, NCAIM B001438 se omogenizează în raport de 1:1, iar 4 părți din pulberea rezultat se amestecă cu o compoziție alcătuit din: făina de orz 40 părți; esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță 19,2 părți; alcool polivinilic 16 părți; lecitina 12 părți; oleat de potasiu 3 părți; glicerol 1,6 părți; trigliceride 1,6 părți; amestecul păstos rezultat se extrudează pe o mașină de făcut paste, tăieții rezultați sunt granulați pe un echipament de sferonizare, iar granulele rezultate sunt uscate într-un uscător în pat fluid, la o temperatură maximă de 37°C.

5. Procedeu de obținere a biopreparatului granular mixt conform **invenției caracterizat prin aceea că** mediul care favorizează formarea granulelor de kefiran este un mediu lichid format din 2% lactoză, 2,5% hidrolizat de lactalbumină, 1% extract de drojdie, 0,4% K_2HPO_4 , 0,4% citrat de triamoniu, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,028% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,02% Zn : glicerol (1:4) 0,058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0,074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

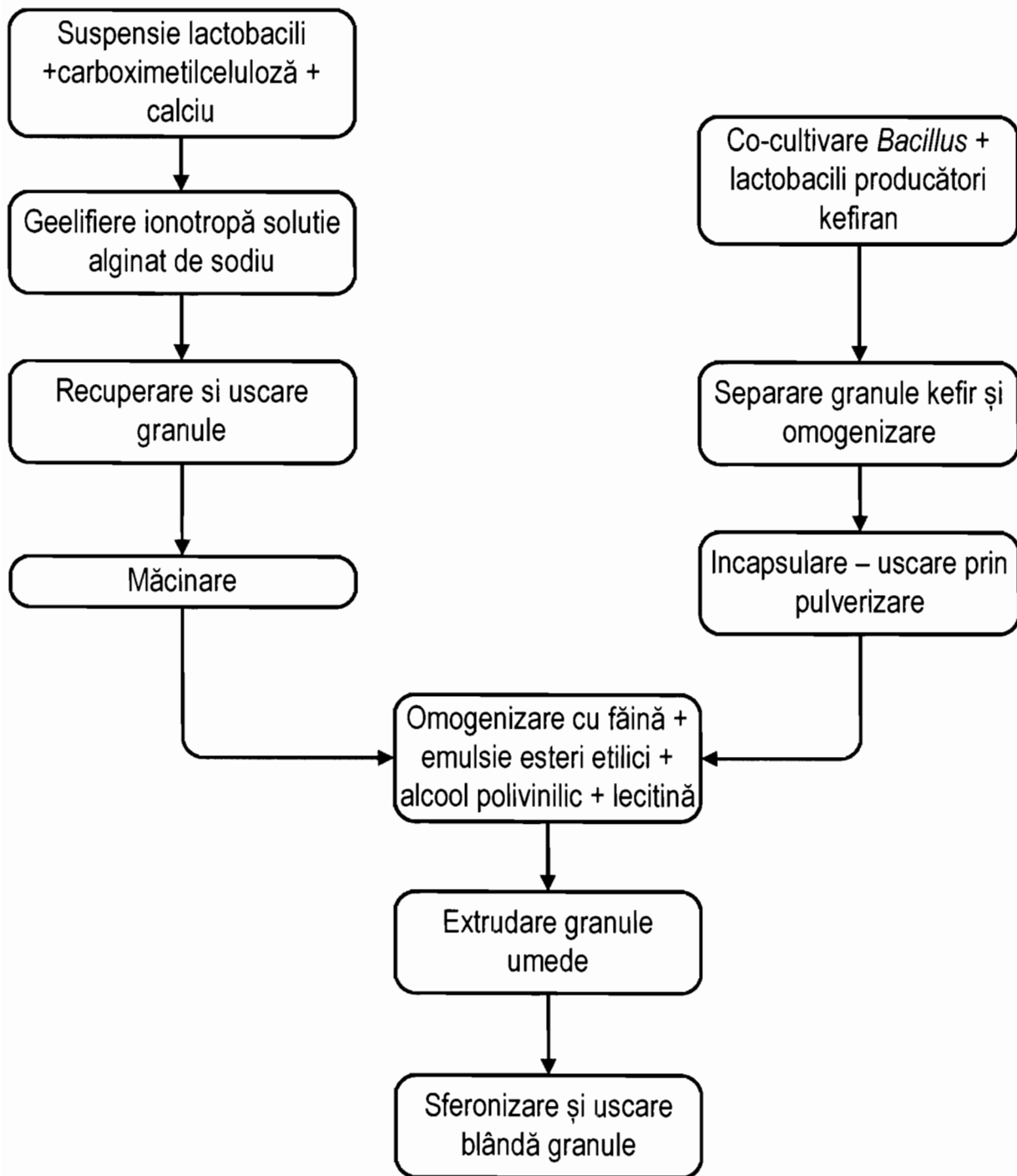


Figura 1