



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00392

(22) Data de depozit: 09/07/2020

(41) Data publicării cererii:  
28/01/2022 BOPI nr. 1/2022

(71) Solicitant:  
• INCDO-INOE 2000, FILIALA INSTITUTUL  
DE CERCETĂRI PENTRU  
INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ  
CLUJ-NAPOCA, STR.DONATH NR.67,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• DINCĂ ZAMFIRA MARIA,  
STR.AL.VLAHUȚĂ NR.4, CĂLIMĂNEȘTI, VL,  
RO

(54) METODĂ MODERNĂ DE OBTINERE DIN CULTURI DE  
BACTERII INDIGENE A UNUI BIOPREPARAT RIZOBIAL  
CU ADAOS DE ZEOLIT ȘI SĂRURI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui biopreparat pe bază de culturi bacteriene rizobiale indigene selecționate, microparticule de zeolit și săruri utilizat ca produs inoculant pentru culturile de soia. Metoda, conform invenției, constă în etapa de preparare a unei suspensii microbiene din culturi primare din tulpini rizobiale izolate din nodozitățile plantelor de soia, prepararea soluției de săruri de Ca, Fe, Mg, Na și K din patru soluții stoc, activarea termică a zeolitului micro-

nizat în prealabil, încorporarea zeolitului activat termic în soluția de săruri în raport 1:1, adăugarea suspensiei bacteriene cu concentrație de  $1 \times 10^7 \dots 1 \times 10^8$  CFU/ml peste zeolitul cu adaus de săruri, rezultând un biopreparat cu eficiență ridicată în fixarea simbiotică a azotului la cultura de soia.

Revendicări: 1  
Figuri: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. ... a 2020 00392
Data depozit ... 09-07-2020

## **Metodă modernă de obținere din culturi de bacterii indigene a unui biopreparat rizobial cu adaos de zeolit și săruri**

### **DESCRIERE**

#### **I. Motivația elaborării invenției**

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui biopreparat pe bază de culturi bacteriene rizobiale indigene cu adaos de microparticule de zeolit și săruri. Biopreparatul poate fi utilizat ca produs inoculant pentru culturile de soia, cu contribuție la creșterea productivității și al conținutului de proteine din boabe. Biopreparatul folosește tulpini rizobiale selecționate din solurile autohtone, adaptate condițiilor eco-pedologice din țara noastră și la cultivarele locale de soia precum și un adaos de zeolit și săruri de calciu (Ca), fier (Fe), magneziu (Mg), sodiu (Na) și potasiu (K).

Folosirea de biopreparate pe bază de tulpini rizobiale la culturile de leguminoase are un rol esențial în fixarea biologică a azotului. La ora actuală se folosesc diverși inoculi comerciali pentru a îmbunătăți fixarea simbiotică a azotului (Getachew et al. 2017; Yang et al., 2018; Belete et al., 2019).

Numeroase studii arată că inocularea cu tulpini rizobiale are un aport semnificativ la creșterea plantelor, dezvoltarea sistemului radicular și a frunzelor, creșterea producției și a conținutului de proteine din boabe (Hungria and Mendes, 2015; Mathenge et al., 2019; Getachew et al. 2017; Aserse et al., 2020).

Prin fixarea biologică a azotului se reduce consumul de fertilizanți pe bază de azot, cu implicații pozitive majore asupra mediului (Hungria and Mendes, 2015; Zimmer et al., 2016). În ciuda acestor beneficii, unele studii au demonstrat o comportare inefficientă a unor inoculi comerciali în diferite zone datorită incompatibilității inoculului la condițiile eco-pedologice și a genotipului folosit. În acest context, izolarea și selecția unor tulpini rizobiale indigene, adaptate la condițiile locale și compatibile cu genotipurile românești de soia reprezintă o necesitate. În același timp, se impune identificarea unor noi formule nutriționale cu rol protector împotriva condițiilor de sol și climă neprielnice dar și de suport energetic în procesul de simbioză dintre inocul și plantă.

## II. Prezentarea stadiului cercetării la momentul actual

La nivel internațional, există o serie de patente înregistrate pe metode de obținere de biopreparate pornind de la inoculi microbieni. Astfel, brevetul cu numărul WO2017216736A1 descrie mai multe metode de preparare și de aplicare a unor formule de bioinoculanți eficienți pe bază de *Rhizobium* spp. cu aplicabilitate pe diverse plante de leguminoase. Procedeele presupun izolarea unor tulpini rizobiale din solul rizosferic forestier, testarea tulpinii pe leguminoase și selectarea tulpinilor care prezintă compatibilitate cu planta gazdă în vederea introducerii ulterioare în cultură.

Metoda brevetată cu brevetul S2012015806A1 este o metodă ecologică ce dezvoltă o formulă eco-friendly pe baza unui consorțiu de izolate microbiene cu rol în îmbunătățirea parametrilor de creștere ai plantelor. Metoda propune o formulă cu constituenți bioactivi care oferă protecție suplimentară împotriva agenților patogeni ai plantei având rol și în solubilizarea mineralelor. Pentru creșterea producției de flori și fructe, brevetul ES2439393A1 descrie o metodă care utilizează o tulpină de *Coletotrichum tofieldiae*. Alte metode de obținere de bioinoculi care utilizează formule cu consorții microbiene cu rol în stimularea creșterii plantelor sunt și cele elaborate în cadrul brevetelor WO2017019633A2 și WO2017127535A1.

O metodă care dezvoltă o nouă formulă de încapsulare microbiană este omologată în cadrul brevetului WO2018002955A1. Conform acestei metode, organismele vii sunt încapsulate într-un polimer permeabil, care permite pătrunderea conținutului celular și nutrițional în miez cu eliberarea controlată a 10 endofite. Această microcapsulare protejează microorganismele împotriva efectelor toxice ale pesticidelor / fungicidelor.

Brevetul cu numărul ES2234417A1 se bazează pe utilizarea într-o formă granulată a două tulpini noi de bacterii ale *Azospirillum* și *Pantoea*, cu capacitatea de a fixa azotul atmosferic. Fertilizantul are rolul de a solubiliza fosfații, precum și alți nutrienți minerali ai solului și de a produce cantități mari de substanțe de stimulare a creșterii plantelor. Metoda de obținere a biofertilizantului are la bază tehnica de adsorbție a microorganismelor la un suport solid, acționând ca un sistem cu eliberare controlată. Tehnica garantează o stabilitate ridicată a viabilității celulare, precum și substanțe nutritive organice și minerale suficiente pentru a facilita colonizarea rădăcinilor plantelor.

Procedeu de obținere a unui biopreparat conform invenției cu numărul RO129419A2 (compus din tulpina *Delftia lacustris* 6BS și tulpina *Pseudomonas sp.12BS*) are capacitatea de a promova creșterea plantelor prin mobilizarea elementelor nutritive din surse organice. Procedeu brevetat presupune cultivarea tulpinii *Delftia lacustris* 6BS și *Pseudomonas sp.12BS* pe medii care conțin zaharoză, făină de azot și săruri minerale, cu cultivare la o temperatură de 28 °C timp de 24 h și agitare în raport gravimetric de 1:1. Invenția cu numărul RO130241A0 face referire la un procedeu de obținere a unui fertilizant lichid organic stabilizat, cu acțiune de stimulare a simbiozelor plantelor de cultură. Fertilizantul utilizează urzici tocate lăsate la macerat în apă de ploaie, fermentarea timp de 4-5 zile la o temperatură de 18-20 °C, omogenizarea maceratului, diluarea de 5 ori și filtrarea pe membrană. Rezultatul constă în obținerea unui filtrat bioactiv cu stabilitate ridicată.

**La nivel național**, deși există metode de obținere de biopreparate brevetate, nu există nicio metodă patentată care utilizează bacteriile rizobiale fixatoare de azot pentru cultura de soia. Conform informațiilor de pe platforma <https://osim.ro/e-osim/> un număr de opt metode de obținere de biopreparate au fost brevetate în România, având formule și aplicabilități diferite. Astfel, brevetul 00128586 descrie o metodă de obținere a unui biopreparat microbial bio(inoculant) folosit pentru plantele de cultură. Metoda de obținere a biopreparatului presupune utilizarea a 0,3 g/l zaharoză, 0,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g/l MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l NaCl, 0,1 g/l extract de drojdie, 0,5 g/l glutamat de sodiu și 0,2 g/l K<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> și adăugarea a 200-250 ml mediu de cultură hidrogelifiat, conținând microorganisme inoculante la 2-5 l de soluție.

Alte metode de obținere de biopreparate au fost elaborate în cadrul brevetelor 00127526, 00126363 și 00126125). Metodele au avut ca scop obținerea unor biopreparate destinate protecției plantelor contra agenților fitopatogeni cu acțiune antifungică sau contra *Trichoderma viride*.

Brevetele 00127488 și 00110780 descriu două procedee de obținere a unor preparate peliculogene cu efecte protectoare, regenerative și cicatrizante destinate uzului uman, în timp ce brevetele 00125200 și 00122013 au fost înregistrate pentru dezvoltarea unor metode de obținere a unor preparate de drojdie seleniată, cu utilizare de *Saccharomyces cerevisiae* și de cupru, zinc și mangan. Metoda are la bază un procedeu de bioconversie microbială.

### III. Scopul și descrierea invenției

Scopul prezentei invenții este de a realiza o metodă de obținere a unui biopreparat inoculant pornind de la culturi rizobiale indigene selecționate la care se adaugă în cantități prestabilite microparticule de zeolit și săruri de Ca, Fe, Mg, Na și K rezultând un preparat cu eficiență ridicată în fixarea simbiotică a azotului la cultura de soia.

### IV. Descrierea invenției

Metoda de obținere a biopreparatului rizobial din culturi de bacterii indigene cu adaos de zeolit natural și săruri de Ca, Fe, Mg, Na și K se compune din următoarele etape: **1)** Prepararea culturii stoc din tulpini rizobiale selecționate dintr-un câmp cultivat cu soia. După prelevare, tulpinile rizobiale vor fi confirmate prin teste morfologice, culturale, tinctoriale și biochimice; **2)** Prepararea suspensiei bacteriene utilizându-se culturi de lucru primare obținute din culturi stoc; **3)** Prepararea soluției de săruri de Ca, Fe, Mg, Na și K din cele patru soluții stoc preparându-se o soluție de lucru, prin adăugarea a câte 1 ml din soluțiile individuale stoc la 1 l volum final de apă distilată; **4)** Activarea termică a zeolitului micronizat în prealabil (0.003 mm) după prelevarea din depozit, spălarea cu apă și uscarea acestuia în mediu ambiental; **5)** Încorporarea zeolitului activat termic în soluția de săruri cu respectarea unui raport de 1:1; **6)** Obținerea biopreparatului cu adaos de zeolit și săruri prin adăugarea suspensiei bacteriene cu concentrația de  $1 \times 10^7$  CFU/ml -  $1 \times 10^8$  CFU/ml peste zeolitul cu adaos de săruri (Fig. 1).

La finalul procesului de obținere a biopreparatului se efectuează testarea parametrilor de calitate ai inoculului urmărindu-se păstrarea viabilității și a concentrației inoculului bacterian din biopreparat. O viabilitate acceptată se consideră atunci când numărul de colonii numărate, după perioada de incubare pe mediu de cultură Manitol Agar cu Extract de Drojii (Vincent, 1970) este de minim 200 CFU/placă. Totodată, coloniile trebuie să prezinte caracteristicile morfologice și culturale ale tulpinii inoculate.

Toate procedurile operaționale și specifice, componente ale procesului de obținere a biopreparatului, trebuie să se execute respectând regulile de sterilitate (sterilizarea ustensilelor, sticlăriei, mediilor, echipamentelor, suprafețelor și spațiilor, folosirea hotei cu flux de aer laminar pentru probe biologice, etc.) și de biosecuritate în laborator conform cu standardul ISO 7218:2007 / AMD 1:2013 și ghidul Eurachem EA 4/10 G:2002/2013.

Aplicarea biopreparatului realizat prin prezenta invenție se face pe sol imediat înainte de semănat pentru eliminarea riscului de deshidratare a celulei bacteriene și de scădere a concentrației inițiale a inoculului. Pentru o conservare adecvată a biopreparatului înainte de semănat, este recomandat ca după preparare acesta să se păstreze la frigider la o temperatură de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  pentru a menține viabilitatea tulpinii bacteriene pentru o durată de max. 12 h de la obținerea biopreparatului. Înainte de inocularea semințelor, biopreparatul care a fost menținut la o temperatură de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  se aclimatizează la temperatură de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  iar aplicarea se va face nu mai târziu de 12 h de la aducerea biopreparatului la temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### IV. Model de aplicare a invenției

Metoda de obținere a biopreparatului bacterian din culturi selecționate, indigene cu etapele componente ale acesteia este prezentată detaliat mai jos:

1. **Prepararea culturii stoc din tulpini rizobiale selecționate.** Tulpinile rizobiale izolate din nodozitățile plantelor de soia (prelevate dintr-un câmp cultivat cu soia) au fost, în prealabil, confirmate prin teste morfologice, culturale, tinctoriale și biochimice. Pe mediul de cultură specific (Manitol Agar cu Extract de Drojdie), tulpinile sunt izolate în cultură pură, respectând procedurile standard microbiologice (pasaje de culturi, transplantări, tehnica de epuizare a ansei). După incubare, tulpinile sunt trecute prin transferul unei încărcături de ansă pe criobile și păstrate la frigider la o temperatură de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Valabilitatea coloniilor bacteriene pe criobile este de 1 an. Pentru obținerea culturii stoc, o încărcătură de ansă bacteriană de pe criobile se trece pe mediul de creștere Manitol Agar cu Extract de Drojdie și se incubează la  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  timp de 4 zile. Cultura stoc obținută se păstrează la frigider la  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  fiind utilizată pentru subculturile ulterioare. Cultura stoc are o valabilitate de patru săptămâni. Din cultura stoc nu se pot face mai mult de patru subculturi datorită riscului de modificare fenotipică a tulpinii bacteriene.
2. **Prepararea suspensiei bacteriene.** Pentru prepararea suspensiei bacteriene se utilizează culturi de lucru primare obținute din culturi stoc. În 5 ml soluție salină fiziologică sterilă se suspendă o ansă cu colonii proaspăt obținute din cultura de lucru primară, după care se agită cu atenție pentru omogenizarea suspensiei bacteriene. Se ajustează inoculul prin

măsurarea densității optice (prin citire la densimat) până la o concentrație a tulpinii de interes de  $1 \times 10^7$ CFU/ml -  $1 \times 10^8$ CFU/ml.

3. **Prepararea soluției de săruri.** În vederea obținerii unui suport nutritiv pentru biopreparat, se prepară patru soluții stoc de săruri cu următoarea compoziție: **soluție stoc I** (dihidrogenofosfat de potasiu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 4,25 g, hidrogenofosfat de potasiu  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 10,87 g, hidrogenofosfat de sodiu heptahidrat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 16,7 g/l), **soluție stoc II** (sulfat de magneziu heptahidrat  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 11,25 g/l; **soluție stoc III** (clorură de calciu anhidru  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 13,75 g/l; **soluție stoc IV**(clorură de fier (III) hexahidratat  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,12 g/l). Soluțiile stoc de săruri se păstrează la frigider având o valabilitate de 6 luni. Din cele patru soluții stoc se prepară o soluție de lucru, adăugându-se câte 1 ml din soluțiile stoc I, II, III, IV la 1 l volum final de apă distilată sterilă.
4. **Activarea termică a zeolitului.** Înainte de activare, zeolitul se macină și se sitează pentru a obține o dimensiune a particulelor de 0,003 mm. După măcinare, se realizează activarea termică a acestuia la 180 °C timp de 2 h în etuvă. După răcire în exicator, zeolitul se cântărește.
5. **Încorporarea zeolitului în soluția de săruri.** Respectând un raport de 1:1, 1 kg de zeolit activat obținut la **punctul 4** se amestecă cu 1 l soluție de lucru obținută la **punctul 3**, iar amestecul se agită continuu timp de 2 h la temperatura de 20 °C. După decantări repetate, se îndepărtează supernatantul astfel încât deasupra stratului de zeolit să rămână o peliculă foarte fină de lichid. Dacă este cazul, amestecul se usucă în etuvă timp de 3 h la o temperatură de 35 °C.
6. **Obținerea biopreparatului cu adaos de zeolit și săruri.** Peste zeolitul cu adaos de săruri obținut anterior (**punctul 5**) se adaugă suspensia bacteriană cu concentrația de  $1 \times 10^7$  CFU/ml -  $1 \times 10^8$ CFU/ml, obținută la **punctul 2**. Biopreparatul astfel obținut se amestecă cu atenție și se usucă în etuvă la o temperatură de 35 °C timp de 24-48 h până la uscarea completă a biopreparatului. După obținere, biopreparatul se păstrează la frigider la temperatura de 5 °C  $\pm$ 2 °C până la aplicarea acestuia pe sol.
7. **Testarea parametrilor de calitate ai inoculului.** După obținerea biopreparatului cu adaos de zeolit și săruri, se verifică parametrii de calitate, respectiv, păstrarea viabilității și a concentrației inoculului bacterian din produs. De asemenea, se verifică aspectul coloniilor pe mediul de cultură în etapa de preparare a suspensiei bacteriene primare. O

viabilitate acceptată se consideră atunci când numărul de colonii numărate, după perioada de incubare pe mediu de cultură Manitol Agar cu Extract de Drojdii este de minim 200 CFU/placă. Totodată, după inoculare pe mediul de cultură și incubare conform cu specificațiile de la **punctul 1**, coloniile trebuie să prezinte caracteristicile morfologice și culturale ale tulpinii inoculate.

8. **Aplicarea inoculului pe sol** se face imediat înainte de semănat pentru eliminarea riscului de deshidratare a celulei bacteriene și de scădere a concentrației inițiale a inoculului.

#### V. Problema tehnică pe care o rezolvă invenția

- Adaptarea tulpinilor rizobiale din biopreparat la condițiile eco-pedologice și genotipurile de soia din țara noastră;
- Costurile mari ale bioinoculilor comerciali folosiți la cultura de soia
- Creșterea eficienței produselor inoculante de tip ecologic utilizate la cultura de soia
- Folosirea redusă a inoculilor în practica agricolă datorită lipsei de informare cu privire la beneficiile aduse în creșterea productivității la culturile de leguminoase.

#### VI. Avantajele aduse de prezenta invenție

Metoda propusă prezintă un grad înalt de originalitate și noutate prin adăugarea de microparticule de zeolit cu rol protector împotriva stresului cauzat de secetă și prin adăugarea de săruri de Ca, Fe, Mg, Na și K asigurând în acest mod atât substratul nutritiv necesar păstrării viabilității bacteriene cât și facilitarea încorporării la nivelul sistemului radicular al plantei.

Principalele avantaje aduse de metoda de obținere propusă sunt:

- Folosirea unor tulpini indigene, selecționate din soluri autohtone și zeolit natural, materii prime ușor de furnizat și necostisitoare;
- Procedeu de obținere este de dificultate moderată, ceea ce permite executarea ca procedeu de rutină în laboratoare cu dotări minimale;
- Eliminarea costurilor cu achiziția unui bioinoculant comercial, care poate fi ineficient pentru condițiile eco-pedologice și genotipurile din țara noastră;
- Fiind utilizate ca materii prime materiale autohtone (nodozitățile de soia, materialul zeolitic) trebuie subliniată și posibilitatea de a utiliza biopreparatul pe scară largă, cu implementare pe piață ca produs comercial asigurând în același timp și valorificarea



superioară într-un produs cu valoare adăugată ridicată a resurselor autohtone de tip vulcanic zeolitic.

În plus, biopreparatul realizat cu metoda propusă, utilizat în tehnologia de cultivare a plantelor de soia aduce beneficii notabile precum:

- Contribuie la popularea solurilor fără istoric de cultivare a leguminoaselor cu bacterii rizobiale selecționate;
- Aduce un aport semnificativ în creșterea conținutului de proteine din semințe și în creșterea productivității la soia;
- Are viabilitate îndelungată și comportare adaptativă ridicată în sol.

### **Bibliografie**

1. Aserse A. A., Markos D., Getachew G., Markku Yli-Halla M., Lindström K., 2020. Rhizobial inoculation improves drought tolerance, biomass and grain yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L.) at Halaba and Boricha in Southern Ethiopia, Archives of Agronomy and Soil Science, 66:4, 488-501, DOI: [10.1080/03650340.2019.1624724](https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1624724);
2. Belete, S., Bezabih, M., Abdulkadir, B., Tolera, A., Mekonnen, K., & Wolde-Meskel, E., 2019. Inoculation and phosphorus fertilizer improve food-feed traits of grain legumes in mixed crop-livestock systems of Ethiopia. *Agriculture, ecosystems & environment*, 279, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.04.014>;
3. Getachew, Z., Abera, G., & Beyene, S., 2017. Rhizobium inoculation and sulphur fertilizer improved yield, nutrients uptake and protein quality of soybean (*Glycine max* L.) varieties on Nitisols of Assosa area, Western Ethiopia. *African Journal of Plant Science*, 11(5), 123-132;
4. Hungria M., Mendes I.C., 2015. Nitrogen fixation with 2 soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. 3 (Ed.) Biological nitrogen fixation. Chapter 99. 4 New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., vol.2. 5 p.1005-1019;
5. Mathenge C., Thuita M., Cargele M., Joseph G-O., Vanlauweb B., 2019. Variability of soybean response to rhizobia inoculant, vermicompost, and a legume-specific fertilizer blend in Siaya County of Kenya. *Soil Tillage Res.* 2019 Nov; 194: 104290. doi: [10.1016/j.still.2019.06.007](https://doi.org/10.1016/j.still.2019.06.007);

6. Vincent J., M., 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP handbook, No. 15. The Blackwell Scientific Publications, Oxford, England;
7. Yang S.H., Chen W.H., Wang E.T., Chen W.F., Yan J., Han X.Z, Tian C.F, Sui X.H., Singh R.P., Jiang G.M. and Chen W.X., 2018. Rhizobial biogeography and inoculation application to soybean in four regions across China. Journal of Applied Microbiology, 125;
8. Zimmer S., Messmer M., Haase T., Piepho H.P., Mindermann A., Schulz H., et al., 2016. Effects of soybean variety and *Bradyrhizobium* strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. Eur J Agron 72: 38;
9. Eurachem EA Guide 4/10 / 2002/2013 – Accreditation for Microbiological Laboratories
10. ISO 7218/ 2007/ Amd.1: 2013 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
11. <https://osim.ro/e-osim/>
12. <https://worldwide.espacenet.com/>

## REVENDICARE

Metoda modernă de obținere din culturi de bacterii indigene a unui biopreparat rizobial cu adaos de zeolit și săruri **caracterizată prin aceea că** are ca etape de preparare: (1) prepararea culturii stoc din tulpini rizobiale selecționate dintr-un câmp cultivat cu soia, (după prelevare, tulpinile rizobiale fiind confirmate prin teste morfologice, culturale, tinctoriale și biochimice), urmată de (2) prepararea suspensiei bacteriene prin utilizarea de culturi de lucru primare obținute din culturi stoc, (3) prepararea soluției de săruri de Ca, Fe, Mg, Na și K din cele patru soluții stoc preparându-se în prealabil o soluție de lucru, prin adăugarea a câte 1 ml din soluțiile individuale stoc la 1 l volum final de apă distilată, urmate de (4) activarea termică a zeolitului micronizat în prealabil (0.003 mm) după prelevarea din depozit, spălarea cu apă și uscarea acestuia în mediu ambiental și (5) încorporarea zeolitului activat termic în soluția de săruri cu respectarea unui raport de 1:1 cu (6) adăugarea suspensiei bacteriene cu concentrația de  $1 \times 10^7$  CFU/ml -  $1 \times 10^8$  CFU/ml peste zeolitul cu adaos de săruri astfel ca la finalul procesului de obținere biopreparatul (7) se testează din punct de vedere al calității parametrilor inoculului și anume păstrarea viabilității și a concentrației inoculului bacterian iar aplicarea biopreparatului realizat se face pe sol imediat înainte de semănat pentru eliminarea riscului de deshidratare a celulei bacteriene și de scădere a concentrației inițiale a inoculului.

Figura 1. Etapele de obținere din culturi de bacterii indigene a unui biopreparat rizobial cu adaos de zeolit și săruri

