



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00146**

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

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
PLANTELOR,**
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,**
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **CONSTANTINESCU FLORICA,**
STR. EMANOIL PORUMBARU NR.67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• **DINU SORINA,**
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ZAMFIROPOL ROXANA, STR.NADEȘ**
NR.42 A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **PONTA CORNELIU CĂTĂLIN,**
STR.AUREL VLAICU NR.138, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **GYONGYVER MARA, PIAȚA LIBERTĂȚII**
NR.10, SC.C, AP.35, MIERCUREA CIUC,
HR, RO;
• **BEATA ABRAHAM, STR.CULMEI NR.11,**
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **LANYI SZABOLCS, STR. MIKO NR.21,**
MIERCUREA CIUC, HR, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI BIOPREPARAT
MICROBIAN (BIO) ÎNOCULANT**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat microbial inoculant, pe bază de microorganisme folositoare plantelor de cultură, și care urmează a fi aplicate pe semințele și/sau solul plantelor de cultură, constând din realizarea unui volum de 10...20 l soluție de aplicare prin dizolvarea, în apă la temperatura mediului ambiant, a 0,3 g/l zaharoză, 0,5 g/l K_2HPO_4 , 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g/l NaCl, 0,1 g/l extract de drojdie, 0,5 g/l glutamat de sodiu și 0,2 g/l

K_2MoO_4 , adăugarea a 200...250 ml mediu de cultură hidrogelifiat, conținând microorganisme inoculante la 2...5 l de soluție, amestecarea suspensiei timp de 10...15 min, decantarea supernatantului cu înlăturarea resturilor de hidrogel, diluarea suspensiei apoase de microorganisme, și aplicarea în brazdă concomitent cu semănatul.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



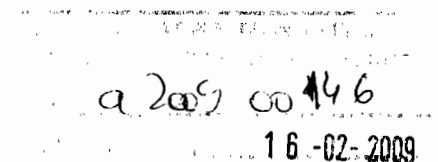
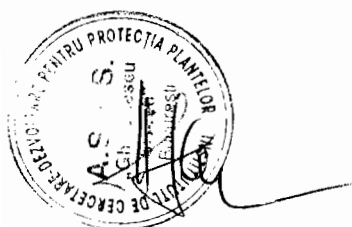
Procedeu de obținere a unui biopreparat microbial (bio)inoculant

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat pe bază de microorganisme folositoare plantelor de cultură, microorganisme care sunt aplicate ca tratament al seminței și/sau al solului și sunt generic denumite microorganisme (agro)/ (bio) inoculante .

Sunt cunoscute diverse procedee de obținere a biopreparatelor pe bază de microorganisme inoculante, microorganisme care au acțiuni multiple asupra plantelor de cultură (furnizare de azot fixat biologic, solubilizare fosfor, biodisponibilizare micro-elemente; protecție împotriva agenților de dăunare; stimularea creșterii plantelor ca urmare a producerii de fitohormoni și precursori în rizoplanul plantelor de cultură etc.) și solului. La câțiva ani după descoperirea simbiozei dintre rhizobii și leguminoase doi cercetători germani (Nobbe și Hiltner) au obținut brevete în Marea Britanie (BP 11460) și SUA (US570813) pentru primul procedeu de obținere și utilizare a unui biopreparat bioinoculant pe bază de bacterii fixatoare de azot în simbioză cu leguminoasele. Aceste prime două brevete se referă la cultivarea unei tulpini de bacterii (specifice pentru o plantă leguminoasă dată) pe un mediu semisintetic (zahăr, asparagină, extract apos din părți verzi de leguminoase), gelificat cu agar - gelatină și repartizat pe peretele inferior al unui flacon de sticlă. Cultura de microorganisme rezultată pe acest mediu gelificat își păstra viabilitatea timp de câteva luni. Flacoanele de sticlă erau transportate la locul aplicării, bacteriile fixatoare de azot fiind reluate într-o soluție apoasă (care includea zahăr, asparagină și extract apos din părți verzi de leguminoase), în proporție de 1...3 litri soluție per flacon. Suspensia astfel rezultată (denumită emulsie de cultură pură în brevetele inițiale) era utilizată pentru tratamentul prin umectare al seminței de leguminoase, prin amestecare viguroasă împreună cu un mediu destinat stimulării dezvoltării bacteriilor inoculate (respectiv soluția de zahăr, asparagină și extract apos din părțile verzi de leguminoase, eventual inclusă de la început în lichidul destinat reluării culturii de pe mediu gelificat) și apoi și cu un material granular uscat (sol, nisip sau materiale similare), destinat prevenirii aglomerării materialului semincer.

În urma criticilor unor utilizatori (care pretindeau că gelatina, fiind o sursă semnificativă de azot fixat, inhibă capacitatea de fixare biologică a azotului) componenta de gelifiere a mediului de cultură a fost limitată numai la agar.

Acest procedeu inițial de producere și utilizare a inoculanților agricoli pe prezenta însă o serie de dezavantaje: (i) prețul de cost ridicat datorită prețului mare al agarului; (ii) termenul de valabilitate relativ scăzut care impunea o



activitate sezonieră de producție; (iii) volumul mare și greutatea ridicată a flacoanelor de sticlă utilizată pentru cultivarea bacteriilor; (iv) slaba reproductibilitate în practică a extractului apos din părți verzi de plante leguminoase utilizat în mediile de cultură gelificate și în cele de stimulare a dezvoltării bacteriilor inoculante; (v) lipsa de selectivitate a sursei de carbon.

Pentru înlăturarea dezavantajelor procedului inițial dezvoltat au fost dezvoltate noi procedee de cultivare și aplicare. Cultivarea în masă a microorganismelor s-a realizat pe medii lichide, aerate și agitate, care au fost considerate mai productive și mai ieftine. S-a eliminat astfel utilizarea agarului ca agent de gelificare. În mediul de cultură extractul apos din părți verzi de plante leguminoase a fost înlocuit cu extract de drojdie, produs mai ușor de obținut și standardizat. Zahărul a fost înlocuit cu polioli derivați din zaharide (ca de exemplu manitolul), pentru a crește selectivitatea sursei de carbon din mediul de cultură. Suspensia de microorganisme în mediul de cultură a fost adsorbită în suporturi de condiționare (de o mare varietate), repartizate în ambalaje din materiale plastice. S-au eliminat astfel flacoanele de sticlă și a crescut rata de supraviețuire a microorganismelor inoculante. Utilizarea unor suporturi de condiționare solide a permis eliminarea etapei de aplicare a materialului granular uscat (destinat prevenirii aglomerării materialului semincer umectat cu suspensie de inoculanți). Pentru creșterea aderenței pe sămânță în momentul tratamentului s-au folosit diferiți adezivi, care fie au fost introduși în suportul de condiționare, fie erau aplicați ca tratament umed concomitent cu inoculanții. Pentru creșterea ratei de supraviețuire a microorganismelor inoculante pe sămânță au fost folosiți polimeri biodegradabili hidrofilii (de ex. derivați de celuloză) și/sau osmoprotectanți (ca de exemplu trehaloza).

Toate aceste perfecționări ale procedului inițial de cultivare și aplicare a microorganismelor inoculante au fost prezentate în brevete (unele deja ajunse în domeniul public) și lucrări științifice, care au fost însumate în manuale și ghiduri de bună practică. Un exemplu este cel al ghidului de bună practică în producerea și aplicarea inoculanților, care a fost publicat de Organizația pentru Alimentație și Agricultură (*Guidelines for inoculant production*, FAO, Roma, 1994).

Procedeele de cultivare și de aplicare dezvoltate inițial pentru bacteriile fixatoare de azot în simbioză cu leguminoasele au fost extinse și pentru alte microorganisme utile plantelor de cultură – bacterii fixatoare de azot asociative și/sau libere în sol, microorganisme care solubilizează fosforul anorganic din sol, rizobacterii favorizante ale creșterii plantelor (PGPR - *plant growth*



promoting rhizobacteria), microorganisme entomopatogene și/sau antagoniste pentru fitopatogeni etc.

Deși foarte larg utilizate și în prezent bioprodusele inoculante condiționate pe suporturi solide prezintă și o serie de dezavantaje legate de condițiile de aplicare (care solicită manoperă suplimentară pentru descărcarea sacilor cu sămânță, umectarea semințelor cu soluții de adezivi, tratarea semințelor cu biopreparat pe suport solid, reînsăcuire, transport la câmp), de aspirarea de pe sămânță în cazul anumitor tipuri de semănători și de compatibilitatea redusă a inoculanților pe suporturi solide aplicați ca tratament la sămânță cu produsele de protecția plantelor aplicate sub aceeași formă de tratament.

Pentru înlăturarea dezavantajelor de mai sus au fost propuse mai multe soluții. Pentru creșterea ratei de supraviețuire la desicare și a compatibilității cu produsele de protecția plantelor au fost descrise procedee prin care se produc bioproduse inoculante cu eliberare controlată destinate (în general) tratamentului solului. Aceste procedee au avantajul și de a permite elaborarea unor bioproduse a căror aplicare asigură o colonizare continuă a rizosferei și a rizoplanului de către microorganismele inoculante eliberate treptat din matricea de condiționare.

Unele procedee implică închiderea microorganismelor în geluri din polimeri biodegradabili urmată de uscarea (micro)granulelor rezultate. Brevetul US4818530 descrie un procedeu de realizare a granulelor de alginat de calciu care conțin spori de ciuperci antagoniste pentru fitopatogeni. Acest procedeu implică amestecarea sporilor de ciuperci antagoniste cu o soluție coloidală de alginat de sodiu, coacervarea picăturilor de amestec alginat - spori într-o soluție de clorură de calciu, urmată de recoltarea și uscarea granulelor. Procedeu are dezavantajul de a utiliza spori de ciuperci recoltate de pe un mediu agarizat, prețul de cost al agarului împiedicând ridicarea la scară. Acest procedeu a fost aplicat de închidere în gel de alginat de calciu a fost extins pentru bacteriile inoculante, cultivate pe medii lichide aerate și agitate (Bashan, 1986, *Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth*, Appl Environ Microbiol., 51, 1089-1098).

Alte procedee de realizare a bioproduselor agroinoculante cu eliberare controlată destinate tratării solului utilizează purtători solizi minerali cu o structură foarte poroasă. Cererea de brevet FR2899580 descrie includerea unor forme L de *Rhizobium* (rezultate prin tratarea cu lizozim a suspensiilor de bacterii obținute după cultivarea 24...48 de ore pe medii lichide) în zeoliți naturali și utilizarea compoziție astfel rezultate. Documentul WO/2004/005219



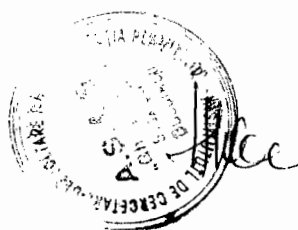
prezintă un procedeu prin care se amestecă o suspensie de rhizobii, turbă, apă și argile (bentonită sau saponită, în proporție de 50...98%), care apoi se granulează și se usucă pentru a se obține o compoziție cu eliberare controlată.

Procedeele care implică bioproduse cu eliberare controlată aplicate la sol au dezavantajul că vehiculează cantități importante de bioproduse și materiale accesorii.

Alte căi de rezolvare a problemelor tehnice asociate dezavantajelor prezentate de bioprodusele inoculante condiționate pe suporturi solide au fost cele care folosesc polimeri hidrofilii. Polimerii superadsorbantți au fost folosiți pentru condiționarea / traparea microorganismelor inoculante. Poli(acril)amida a fost printre primii polimeri propuși ca alternativă la suporturile solide (Domergues și Hoang, *Polyacrylamide entrapped Rhizobium as inoculant for legumes*, 1979, Appl. Environ. Microbiology 37, 779-781). În lucrarea citată autorii au demonstrat că rhizobiile cultivate pe medii lichide și condiționate prin închidere în gel de poli(acril)amidă au aceeași eficacitate ca și cele adsorbite în turbă neagră. Producerea poli(acril)amidei implică însă utilizarea unor monomeri neurotoxici și a unui personal înalt calificat, fapt care a limitat extinderea acestei soluții de condiționare.

În brevetul US4975105 este descris un biopreparat pe baza microorganismelor inoculante din categoria ciupercilor de exomicoriză (*Suillus luteus*; *Pisolithus tinctorius*), în care respectivele microorganisme inoculante sunt incluse într-un polimer superadsorbant (poli(acril)at și săruri de poli(acril)at; co-polimeri de poli(acril)at cu poli(acril)amidă și/sau alcool polivinilic), care este gonflat în apă la de 300...500 ori greutatea inițială, și în care sunt apoi introduse rădăcinile plantelor tratate. Procedeu descris prin brevetul US4975105 este limitat numai la tratamentul arborilor și arbuștilor aflați în curs de transplantare la locul definitiv.

S-au realizat și procedee de producere a inoculanților pe medii lichide cu viscozitate ridicată. Brevetul US6606822 descrie o compoziție de inoculant lichid, rezultată prin amestecarea în proporție de 1:1 a suspensiei de microorganisme rezultate după cultivare timp 7 zile în mediul de cultură lichid cu o soluție conținând 3% polivinilpirolidonă și 0,2% K_2MoO_4 , care asigură o bună supraviețuire a rhizobiilor, atât în suportul de condiționare, cât și pe semințele tratate. În brevetul US7022644 compoziția lichidă pentru păstrarea pe timp îndelungat a rhizobiilor inoculante este realizată prin adăugarea peste suspensia de microorganisme rezultată după cultivare timp de 96 de ore în mediul de cultură lichid a maltozei (solidă și sirop) și a sorbatului de potasiu. Cererea de brevet SUA 2007/00 68072 protejează un procedeu în care



bacteriile inoculante (fixatoare de azot sau favorizante ale creșterii plantelor) sunt cultivate pe mediu lichid, aerat și agitat, recoltate aseptice și apoi trecute pe un mediu (semi)lichid care conține un amestec de derivați de celuloză - polimeri solubili și surse de carbon constând în aminoacizi, amidon, manitol, dextrine, maltodextrine, singure sau în amestec.

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

În cazul în care se folosesc medii gelificate pentru multiplicarea microorganismelor inoculante gelifierea se realizează cu agar, prețul de cost al acestui material obținut prin recoltare din natură împiedicând extinderea pe scară largă a unor astfel de soluții tehnice.

Un alt dezavantaj al procedeelelor descrise mai sus este specificitatea lor ridicată, respectiv dezvoltarea lor preponderent pentru un anumit tip de microorganism inoculant. Corolarul acestui tip de specificitate ridicată este lipsa unor procedee care să ofere condiții favorabile pentru dezvoltarea unor consorții microbiene de consens prin co-cultivarea diferitelor tulpini compatibile de microorganisme inoculante.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de obținere a unui biopreparat pe bază de microorganisme inoculante prin care să se favorizeze dezvoltarea tulpinilor cu creștere lentă și producerea masivă de exopolizaharid, formarea de consorții microbiene de consens prin co-cultivarea diferitelor tulpini compatibile de microorganisme inoculante și o supraviețuire pe termen lung a microorganismelor cultivate.

Procedeu de obținere a unui biopreparat microbial (bio)inoculant conform invenției este alcătuit din următoarele etape: prepararea unui mediu de cultură lichid specific pentru tulpinile de microorganisme inoculante care urmează a fi (co)cultivate; adăugarea la mediul de cultură lichid a unor granule de hidrogel - polimer hidrofili superadsorbant (copolimer poli-acrilat - poli-acrilamidă), în proporție de 1g polimer superadsorbant la 100...200 ml mediu de cultură; gonflarea hidrogelului - polimerului superadsorbant și scurgerea excesului de mediu de cultură; distribuirea a 200...250 ml mediu de





cultură adsorbit în polimerul superadsorbant gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 400...500 ml și sigilarea prin termosudare a pungii; sterilizarea la 121°C, timp de 20min a pungilor de polipropilenă cu mediu de cultură adsorbit în polimeri hidrofilii; inocularea fiecărei pungi prin injectarea aseptică cu 1,5...2ml de suspensie 10^6 ... 10^8 ufc/ml microorganisme inoculante; sigilarea în condiții aseptice a găurii rezultate la inoculare și incubarea timp de 3...7 zile la temperatura optimă de creștere a tulpinilor de microorganisme inoculante; reambalarea pungilor de polipropilenă, cu mediu de cultură adsorbit în polimeri superadsorbanti, pe care au crescut microorganisme inoculante, în pungi de polietilenă de dimensiuni mai mari, etichetarea și depozitarea timp de 2...12 luni în locuri ferite de umiditate, lumină și căldură excesivă.

Procedeul de cultivare conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- (i) prețul de cost scăzut datorită prețului de cost scăzut al hidrogelurilor superadsorbante (larg utilizate în igiena personală sau pentru menținerea apei în solurile / substraturile de cultură nisipoase);
- (ii) favorizarea formării de biofilme de către microorganismele cultivate pe mediile hidrogelifiate, fapt care permite dezvoltarea corespunzătoare a tulpinilor cu creștere lentă și producere masivă de exopolizaharid, ca și constituirea consorțiilor microbiene de consens;
- (iii) supraviețuirea pe termen lung a microorganismelor cultivate în stare sesilă (incluse în biofilme), care asigură un termen de valabilitate ridicat și permite o ritmicitate corespunzătoare a activității de producție, pe tot parcursul anului;
- (iv) volumul mic al ambalajelor, ca și o masă totală de depozitat și transportat foarte apropiată de cea netă;
- (v) posibilitatea utilizării procedurii pentru toate categoriile de microorganisme inoculante;
- (vi) asigurarea unor compoziții specifice, cu selectivitatea ridicată pentru fiecare tip de tulpină de microorganism inoculant;
- (vii) acumularea în biomasa microbiană cultivată în biofilme de compuși hidrofilii și osmoprotectanți, cu rol de creștere a ratei de supraviețuire la desicare.

Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple.

Exemplul 1. Se prepară 1l de mediu Lazareva cu următoarea compoziție: manitol – 10g/l; K_2HPO_4 – 0,5g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2g/l; NaCl – 0,2g/l; $CaSO_4$ – 0,1g/l; $MnSO_4$ – 0,005g/l; $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,002g/l; extract de drojdii – 1g/l.



Ingredientele mediului de cultură se dizolvă pe rând în circa 800ml apă distilată, se aduce la 1000 ml cu apă distilată, se verifică și se corectează dacă este nevoie la pH 6,8. Se adăugă la 1000ml mediu de cultură lichid Lazareva 5g de hidrogel - polimer hidrofil superadsorbant (Aquasorb, copolimer poli-acrilat - poli-acrilamidă destinat pentru reținerea apei în sol și substraturi de creștere, produs de Snf Floerger, Franța), se așteaptă 15min pentru gonflarea hidrogelului - polimerului superadsorbant și apoi se scurge excesul de mediu de cultură. Se distribuie 200ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 400ml și se sigilează punga prin termosudare. Pungile de polipropilenă cu mediu de cultură adsorbit în hidrogeluri superadsorbante se sterilizează la 121°C, timp de 20min. Se inoculează fiecare pungă prin injectarea aseptică cu 2ml de suspensie 10^6 ufc/ml, tulpina SO₆₀₀ de *Bradyrhizobium japonicum* (număr de depunere (număr de depunere NCAIM 001354). Se resigilează punga în condiții aseptice și se incubă timp de 7 zile la temperatura de 28°C. După 7 zile de incubare se scot pungile cu hidrogel din incubator, se reambalează în pungi de polietilenă de dimensiuni mai mari, se etichetează și se depozitează în locuri ferite de umiditate, lumină și căldură excesivă.

Aplicarea microorganismelor s-a realizat în condiții controlate (seră), pentru a se testa procedeul de aplicare și a se verifica păstrarea calităților biologice ale tulpinii de *Bradyrhizobium japonicum* după cultivare pe medii hidrogelifiate. S-au realizat 2l de soluție (de aplicare) cu următoarea compoziție: 3,0g/l zaharoză; 0,5g/l K₂HPO₄; 0,2g/l MgSO₄·7H₂O; 0,1g/l NaCl; 0,1g/l extract de drojdie; 0,5g/l glutamat de sodiu, 0,2g/l K₂MoO₄. Ingredientele au fost dizolvate pe rând în apă dură standard (considerată în literatura de specialitate ca fiind un etalon pentru apa de fântână). Apa dură standard s-a obținut prin amestecarea a 68,5ml soluție A cu 17ml soluție B într-un berzelius de 1000ml. S-a diluat apoi cu circa 800ml apă distilată și s-a adus pH-ul la 6...7 prin adăugare de NaOH 0,1N. S-a transferat într-un vas cotelat de 1000ml și s-a adus la semn cu apă distilată.

Soluția A s-a preparat astfel: S-au cântărit 4g carbonat de calciu și s-au transferat într-un flacon conic de 50ml, cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat încet 82ml HCl 1N, agitând conținutul. Când tot carbonatul de calciu s-a dizolvat, s-a diluat soluția la circa 400ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO₂. S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu soluție de amoniac 1N până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotelat de 1000ml,



s-a adus la semn cu apă distilată și apoi s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon de polietilenă.

Soluția B s-a preparat astfel: s-au cântărit exact 1,613g oxid de magneziu și s-au transferat într-un flacon de 500ml cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat 82ml HCl 1N. S-a reîncălzit încet până la dizolvare, s-a diluat la circa 400ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO₂. S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu o soluție de amoniac 1N până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000ml, s-a adus la semn cu apă distilată și s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon de polietilenă.

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

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



Exemplu 3. Procedul descris în cazul exemplului 1 se repetă pentru un consorțiu format din *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Mz269 (număr de depozitare NCAIM B 001351) și *Paenibacillus graminis* FL400 (număr de depozitare NCAIM B 001361) cu următoarele diferențe: se folosește tot mediu Lazareva, dar se distribuie 250ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 500ml. Se incubă timp de 3 zile la temperatura de 29°C. La aplicare punga cu cei 250ml de mediu de cultură hidrogelificat pe care a crescut consorțiul bacterian politulpinal au fost diluați cu 5l de soluție de aplicare, care au fost apoi diluați 1 la 4, din suspensia finală inoculându-se solul. Pentru testarea procedului de aplicare și verificarea păstrării activității biologice după cultivare pe hidrogel s-au folosit semințe de mazăre (*Pisum sativum* cv. Dora) fiecare bob fiind amplasat la câte 10cm unul de altul. Plantele rezultate din semințele însămânțate în sol tratat cu bacterii inoculante au fost crescute în condiții controlate (temperatură de 22°C±1°C, iluminare 12h pe zi cu 250μmol fotoni m⁻²s⁻¹, umectare substrat de creștere la 80% capacitate de reținere a apei).

În cazul experimentelor de aplicare realizate în condiții controlate s-a urmărit influența procedului de obținere a biopreparatelor cu microorganisme inoculante, cultivate pe medii hidrogelificate conform invenției și aplicate în doze corespunzătoare celor de 200 de litri /ha, asupra unor caracteristici biologice (activitatea acetilenreductazică, inducerea proteinelor asociate cu rezistența indusă sistemic) aflate în directă legătură cu acțiunea microorganismelor inoculante.

După 30 de zile de cultivare s-au recoltat plantele din toate cele trei experimente realizate cu biopreparate realizate conform celor trei exemple de realizare a invenției

S-au prelevat nodulii plantelor de soia și mazăre în care s-a estimat activitatea nitrogenazică prin determinare activității acetilenreductazice).

În plantele de castraveți provenite din semințe însămânțate în sol inoculat cu ciuperci antagoniste *Trichoderma viride* Td50 s-a determinat activitatea polifenoloxidazei, enzimă marker pentru inducerea la nivel sistemic a rezistenței dobândite (SAR). În fiecare caz de testare a biopreparatelor obținute conform exemplurilor de realizare s-a lucrat cu variante martor în care respectivele tulpini de microorganisme inoculante au fost cultivate pe mediile corespunzătoare, prezentate în exemplele 1-3, agarizate, iar reluarea de pe respectivele medii și aplicarea s-a realizat cu tampon fosfat steril.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tab. 1.



Tab.1. Influența cultivării pe medii hidrogelifiate asupra păstrării caracteristicilor biologice ale tulpinilor de microorganisme inoculante.

Variantă experimentală	Activitate nitrogenică ($\mu\text{moli C}_2\text{H}_4/\text{g}$ noduli proaspeți)	Activitatea polifenoloxidazei (UI*/mg substanță proaspătă)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SO ₆₀₀ cultivat pe mediu Lazareva agarizat	10,2±1,4	-
Conform exemplu 1	12,6±1,7	-
<i>Trichoderma viride</i> Td50 cultivat pe mediu Weindling agarizat	-	2,7±0,24
Conform exemplu 2	-	3,1±0,37
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Mz269 și <i>Paenibacillus graminis</i> FL400 cultivat pe mediu Lazareva agarizat	12,8±2,2	-
Conform exemplu 3	15,2±2,8	-

*O unitate enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă ce determină absorbanta la 420nm în mediul de reacție (0,6ml soluție de catechol 0,01M în tampon fosfat de potasiu 0,01M, pH 6.2) cu 0,01/minut.

Aceste rezultate demonstrează păstrarea caracteristicilor tulpinilor inoculante după cultivare conform procedurii de obținere a biopreparatelor bioinoculante descris în această invenție.



Revendicare

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

