



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27.02.2015** BOPI nr. **2/2015**

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

(73) Titular:
• **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.D 7, 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;*
• **ABRAHAM BEATA,** *STR.CULMEI NR.11,
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;*
• **SZABOLCS LANYI,** *STR.MIKO NR.21,
MIERCUREA CIUC, HR, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4818530; US 2007/0068072 A1

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



RO 128586 B1

1 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 trata-
3 ment al seminței și/sau al solului, și sunt generic denumite microorganisme agro/bioinoculante.

5 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;
7 protecție împotriva agenților dăunători; stimularea creșterii plantelor, ca urmare a producerii
de fitohormoni și precursori în rizoplanul plantelor de cultură etc.) și solului. La câțiva ani
9 după descoperirea simbiozei dintre rhizobi și leguminoase, doi cercetători germani (Nobbe
si Hiltner) au obținut brevete în Marea Britanie (**GB 189511460**) și Statele Unite ale Americii
11 (**US 570813**), 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
13 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
15 leguminoase), gelifiat cu agar-gelatină și repartizat pe peretele inferior al unui flacon de
sticlă. Cultura de microorganisme, rezultată pe acest mediu gelifiat, își păstra viabilitatea timp
17 de câteva luni. Flacoanele din sticlă erau transportate la locul aplicării, bacteriile fixatoare de
azot fiind reluate într-o soluție apoasă (care includea zahăr, asparagină și extract apos din
19 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
21 tratamentul prin umectare al seminței de leguminoase, prin amestecare viguroasă, împreună
cu un mediu destinat stimulării dezvoltării bacteriilor inoculate (respectiv, soluția de zahăr,
23 asparagină și extract apos din părțile verzi de leguminoase, eventual inclusă de la început
în lichidul destinat reluării culturii de pe mediu gelifiat) și apoi și cu un material granular uscat
25 (sol, nisip sau materiale similare), destinat prevenirii aglomerării materialului semincer.

27 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.

29 Acest procedeu inițial, de producere și utilizare a inoculanților agricoli, prezenta însă
o serie de dezavantaje: (i) prețul de cost ridicat, datorită prețului mare al agarului; (ii)
31 termenul de valabilitate relativ scăzut care impunea o activitate sezonieră de producție; (iii)
volumul mare și greutatea ridicată a flacoanelor de sticlă utilizate pentru cultivarea bacteriilor;
33 (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
35 bacteriilor inoculante; (v) lipsa de selectivitate a sursei de carbon.

37 Pentru înlăturarea dezavantajelor procedeuului inițial dezvoltat, au fost dezvoltate noi
procedee de cultivare și de 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
39 eliminat astfel utilizarea agarului ca agent de gelifiere. În mediul de cultură, extractul apos,
din părți verzi de plante leguminoase, a fost înlocuit cu extract de drojdie, produs mai ușor
41 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.
43 Suspensia de microorganisme, în mediul de cultură, a fost adsorbită în suporturi de condițio-
nare (de o mare varietate), repartizate în ambalaje din materiale plastice. S-au eliminat astfel
45 flacoanele din sticlă și a crescut rata de supraviețuire a microorganismelor inoculante.
Utilizarea unor suporturi de condiționare solide a permis eliminarea etapei de aplicare a
47 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 hidrofili (de exemplu, derivați de celuloză) și/sau osmoprotectanți (ca, de exemplu, trehaloza).	1
Toate aceste perfecționări ale procedurii 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 astfel de exemplu este cel al ghidului de bună practică în producerea și aplicarea inoculanților, care a fost publicat de Organizația pentru Alimentație și Agricultură (<i>Guidelines for inoculant production</i> , FAO, Roma, 1994).	3 5 7 9
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 - <i>plant growth promoting rhizobacteria</i>), microorganisme entomopatogene și/sau antagoniste pentru fitopatogeni etc.	11 13 15
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.	17 19 21 23
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 protecție a 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.	25 27 29
Unele procedee implică închiderea microorganismelor în geluri din polimeri biodegradabili, urmată de uscarea micro granulelor rezultate. US 4818530 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 în gel de alginat de calciu, care a fost extins pentru bacteriile inoculante, cultivate pe medii lichide, aerate și agitate (Bashan, 1986, <i>Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plantgrowth</i> , Appl Environ Microbiol., 51, 1089-1098).	31 33 35 37 39 41
Alte procedee de realizare a bioproduselor agroinoculante cu eliberare controlată, destinate tratării solului, utilizează purtători solizi, minerali, cu o structură foarte poroasă. FR 2899580 descrie includerea unor forme L de <i>Rhizobium</i> (rezultate prin tratarea cu lizozim a suspensiilor de bacterii, obținute după cultivarea timp de 24...48 h pe medii lichide) în zeoliți naturali și utilizarea compoziției astfel rezultate. Documentul WO/2004/005219 A1 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.	43 45 47 49

1 Procedeele care implică bioproduse cu eliberare controlată, aplicate la sol, au dez-
avantajul că vehiculează cantități importante de bioproduse și materiale accesorii.

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

13 În **US 4975105**, este descris un biopreparat pe baza microorganismelor inoculante
din categoria ciupercilor de exomicoriză (*Suillus luteus*; *Pisolithus tinctorius*), în care respec-
15 tivele microorganisme inoculante sunt incluse într-un polimer superadsorbant (poliacrilat și
săruri de poliacrilat, copolimeri de poliacriilați cu poliacrilamidă și/sau alcool polivinilic), care
17 este gonflat în apă la de 300...500 ori greutatea inițială, și în care sunt apoi introduse
rădăcinile plantelor tratate. Procedul descris prin brevetul **US 4975105** este limitat numai
19 la tratamentul arborilor și arbuștilor aflați în curs de transplantare la locul definitiv.

21 S-au realizat și procedee de producere a inoculanților pe medii lichide cu viscozitate
ridicată. **US 6606822 B2** descrie o compoziție de inoculant lichid, rezultată prin amestecarea,
23 în proporție de 1:1, a suspensiei de microorganisme, rezultată după cultivare, timp 7 zile, în
mediul de cultură lichid, cu o soluție conținând 3% polivinilpirolidonă și 0,2% K_2MoO_4 , care
25 asigură o bună supraviețuire a rhizobiilor, atât în suportul de condiționare, cât și pe semințele
tratate. În **US 7022644 B2**, compoziția lichidă, pentru păstrarea pe timp îndelungat a
27 rhizobiilor inoculante, este realizată prin adăugarea, peste suspensia de microorganisme,
rezultată după cultivare timp de 96 h în mediul de cultură lichid, a maltozei (solidă și sirop)
și a sorbatului de potasiu. **US 2007/00 68072 A1** descrie un procedeu în care bacteriile
29 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
31 un amestec de derivați de celuloză - polimeri solubili și surse de carbon constând în
aminoacizi, amidon, manitol, dextrine, maltodextrine, singure sau în amestec.

33 Cu foarte puține excepții, toate procedeele de obținere, dezvoltate până acum, pre-
zintă dezavantajul de a implica o etapă de cultivare în masă a microorganismelor inoculante,
35 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
37 masivă de exopolizaharid, adică tocmai tulpinile pe care studiile efectuate le-au dovedit a fi
cu eficacitate și competitivitate ridicată, (Leigh și Coplin, 1992, *Exopolysaccharides in Plant-*
39 *Bacterial Interactions, Annu. Rev. Microbiol.*, 46:307-46).

41 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.

43 Un alt dezavantaj al procedeelelor descrise mai sus este specificitatea ridicată a
acestora, respectiv, dezvoltarea lor preponderentă pentru un anumit tip de microorganism
45 inoculant. Corolarul acestui tip de specificitate ridicată este lipsa unor procedee care să ofere
condiții favorabile pentru dezvoltarea unor consorții microbiene de consens prin cocultivarea
47 diferitelor tulpini compatibile de microorganisme inoculante.

RO 128586 B1

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 consoții microbiene de consens prin cocultivarea diferitelor tulpini compatibile de microorganisme inoculante și o supraviețuire pe termen lung a microorganismelor cultivate.

Procedeul de obținere a unui biopreparat microbial, bioinoculant, conform invenției, este alcătuit din următoarele etape: realizarea unui volum de 10...20 l de soluție de aplicare, prin dizolvarea, în apă proaspătă de fântână, la temperatura mediului ambiant, a cantităților de substanțe corespunzătoare următoarelor concentrații: 3,0 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; 0,2 g/l K_2MoO_4 ; adăugarea a 200...250 ml de mediu de cultură hidrogelifiat, conținând microorganisme inoculante, crescute pe acest mediu, la 2...5 l de soluție de aplicare; amestecarea suspensiei rezultate, timp de 10...15 min; decantarea supernatantului și înlăturarea resturilor de hidrogel; diluarea în suspensie de microorganisme în soluție de aplicare cu apă proaspătă de fântână, până la realizarea unor norme de aplicare cuprinse între 91 și 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 și 3 bari ale echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- 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);

- 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 consoțiilor microbiene de consens;

- 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;

- volumul mic al ambalajelor, cât și o masă totală de depozitat și de transportat foarte apropiată de cea netă;

- posibilitatea utilizării procedeuului pentru toate categoriile de microorganisme inoculante;

- asigurarea unor compoziții specifice, cu selectivitate ridicată, pentru fiecare tip de tulpină de microorganism inoculant;

- acumularea, în biomasa microbială cultivată în biofilme, de compuși hidrofilii și osmoprotectanți, cu rol de creștere a ratei de supraviețuire la desicare.

Mediul de cultură hidrogelifiat, conținând microorganisme inoculante, se realizează prin următoarele etape: prepararea unui mediu de cultură lichid specific pentru tulpinile de microorganisme inoculante care urmează a fi cocultivate; adăugarea, la mediul de cultură lichid, a unor granule de hidrogel - polimer hidrofil superadsorbant (copolimer poli-acrilat - poli-acrilamidă), în proporție de 1 g 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 20 min, a pungilor de polipropilenă cu mediu de cultură adsorbit în polimeri hidrofilii; inocularea fiecărei pungi prin injectarea aseptică cu 1,5...2 ml de suspensie 10^6 ... 10^8 ufc/ml microorganisme inoculante; sigilarea, în condiții

RO 128586 B1

1 aseptică, a găurii rezultate la inoculare și incubarea timp de 3...7 zile, la temperatura optimă
de creștere a tulpinilor de microorgansime inoculante; reambalarea pungilor de polipropilenă,
3 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
5 de 2... 12 luni, în locuri ferite de umiditate, lumină și căldură excesivă.

Prezenta invenție se ilustrează prin următoarele exemple.

7 **Exemplul 1.** Se prepară 1 l de mediu Lazareva, cu următoarea compoziție: manitol -
10 g/l, K_2HPO_4 - 0,5 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2 g/l, NaCl - 0,2 g/l, $CaSO_4$ - 0,1 g/l, $MnSO_4$ -
9 0,005 g/l, $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,002 g/l și extract de drojdii - 1 g/l.

11 Ingredientele mediului de cultură se dizolvă, pe rând, în circa 800 ml apă distilată, se
aduce la 1000 ml, cu apă distilată, se verifică și se corectează, dacă este nevoie, la pH 6,8.
13 Se adăugă, la 1000 ml mediu de cultură lichid Lazareva, 5 g de hidrogel - polimer hidrofil
superadsorbant (Aquasorb, copolimer poli-acrilat - poli-acrilamidă, destinat reținerii apei în sol
și substraturi de creștere, produs de SNF Floerger, Franța), se așteaptă 15 min, pentru
15 gonflarea hidrogelului - polimerului superadsorbant, și apoi se scurge excesul de mediu de
cultură. Se distribuie 200 ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant, gonflat
17 într-o pungă de polipropilenă cu volum de 400 ml și se sigilează punga prin termosudare.
Pungile de polipropilenă, cu mediu de cultură adsorbit în hidrogeluri superadsorbante, se
19 sterilizează la 121°C, timp de 20 min. Se inoculează fiecare pungă, prin injectarea aseptică
cu 2 ml de suspensie 10^6 ufc/ml, tulpina SO_{600} de *Bradyrhizobium japonicum* (număr de
21 depunere NCAIM 001354). Se resigilează punga în condiții aseptice și se incubează timp de
7 zile, la temperatura de 28°C. După 7 zile de incubare, se scot pungile cu hidrogel din
23 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.

25 Aplicarea microorganismelor s-a realizat în condiții controlate (seră), pentru a se testa
procedul de aplicare și a se verifica păstrarea calităților biologice ale tulpinii de
27 *Bradyrhizobium japonicum*, după cultivare pe medii hidrogelifiate. S-au realizat 2 l de soluție
de aplicare, cu următoarea compoziție: 3,0 g/l zaharoză; 0,5 g/l K_2HPO_4 ; 0,2 g/l
29 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/l NaCl; 0,1 g/l extract de drojdie; 0,5 g/l glutamat de sodiu, 0,2 g/l
 K_2MoO_4 . Ingredientele au fost dizolvate, pe rând, în apă dură standard (considerată în
31 literatura de specialitate ca fiind un etalon pentru apa de fântână). Apa dură standard s-a
obținut prin amestecarea a 68,5 ml soluție A cu 17 ml soluție B, într-un berzelius de 1000 ml.
33 S-a diluat apoi cu circa 800 ml apă distilată și s-a adus pH-ul la 6...7, prin adăugare de NaOH
0,1 N. S-a transferat într-un vas cotat de 1000 ml și s-a adus la semn cu apă distilată.

35 **Soluția A** s-a preparat astfel: s-au cântărit 4 g carbonat de calciu și s-au transferat
într-un flacon conic de 50 ml, cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat încet
37 82 ml HCl 1 N, agitând conținutul. Când tot carbonatul de calciu s-a dizolvat, s-a diluat
soluția, la circa 400 ml, cu apă distilată și s-a fiert, pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția
39 și apoi s-au adăugat două picături de soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu soluție de
amoniac 1 N, până la o culoare intermediară, portocalie. S-a transferat cantitativ într-un
41 balon cotat de 1000 ml, s-a adus la semn cu apă distilată și apoi s-a transvazat, pentru
păstrare, într-un flacon de polietilenă.

43 **Soluția B** s-a preparat astfel: s-au cântărit exact 1,613 g oxid de magneziu și s-au
transferat într-un flacon de 500 ml, cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat 82
45 ml HCl 1 N. S-a reîncălzit încet până la dizolvare, s-a diluat la circa 400 ml, cu apă distilată
și s-a fiert, pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături de
47 soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu o soluție de amoniac 1 N, până la o culoare
intermediară, portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml, s-a adus la
49 semn cu apă distilată și s-a transvazat, pentru păstrare, într-un flacon de polietilenă.

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

Exemplul 2. Procedul descris în cazul exemplului 1 se repetă pentru tulpina Td50 de *Trichoderma vinde* (număr de depozit NCAIM001358), cu următoarele diferențe: se folosește mediul Weindling, cu următoarea compoziție: glucoză 25 g/l, bactopectonă 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ 1 g/l, FeCl₃ 0,1 g/l și pH 6,4. Se distribuie 250 ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant, gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 500 ml. Se incubează timp de 7 zile, la temperatura de 25°C. La aplicare, cei 250 ml de mediu de cultură hidrogelifiat din pungă, pe care au crescut ciupercile antagoniste, au fost diluați cu 2,5 l de soluție de aplicare, care au fost apoi diluați 1 la 10, 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 castraveți (*Cucumis sativus*, ev. Joker), fiecare sămânță fiind amplasată la câte 10 cm, una de alta.

Exemplul 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 mediul Lazareva, dar se distribuie 250 ml mediu de cultură adsorbit în polimerul superadsorbant, gonflat într-o pungă de polipropilenă cu volum de 500 ml. Se incubează timp de 3 zile, la temperatura de 29°C. La aplicare, cei 250 ml de mediu de cultură hidrogelifiat din pungă, pe care a crescut consorțiul bacterian politulpinal, au fost diluați cu 5 l 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* ev. Dora), fiecare bob fiind amplasat la câte 10 cm, unul de altul. Plantele rezultate din semințele însămânțate în solul tratat cu bacterii inoculante au fost crescute în condiții controlate (temperatură de 22°C±1°C, iluminare 12 h pe zi, cu 250 μmol 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 microorganismele inoculante, cultivate pe medii hidrogelifiate, conform invenției, și aplicate în doze corespunzătoare celor de 200 l/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 de mazăre, în care s-a estimat activitatea nitrogenazică, prin determinarea 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-au realizat cu tampon fosfat steril.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor.

Tabel

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

Varianta experimentală	Activitatea 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 mediul Lazareva agarizat Conform exemplu 1	10,2±1,4 12,6±1,7	- -
<i>Trichoderma viride</i> Td50, cultivat pe mediul Weindling agarizat Conform exemplului 2	- -	2,7 ± 0,24 3,1 ± 0,37
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Mz269 și <i>Paenibacillus graminis</i> FL400, cultivat pe mediul Lazareva agarizat Conform exemplului 3	12,8 ± 2,2 15,2 ± 2,8	- -

*O unitate enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă ce determină absorbanta la 420 nm în mediul de reacție (0,6 ml soluție de catechol 0,01 M în tampon fosfat de potasiu 0,01 M, pH 6,2) cu 6,0 l/min.

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

Procedeu de obținere a unui biopreparat microbial, bioinoculant, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: realizarea unui volum de 10...20 l de soluție de aplicare prin dizolvarea în apă proaspătă de fântână, la temperatura mediului ambiant, a cantităților de substanțe corespunzătoare următoarelor concentrații: 3,0 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 de mediu de cultură hidrogelificat, conținând microorganisme inoculante, crescute pe acest mediu, la 2...5 l de soluție de aplicare; amestecarea suspensiei rezultate, timp de 10...15 min; decantarea supernatantului și înlăturarea resturilor de hidrogel; diluarea suspensiei de microorganisme în soluție de aplicare cu apă proaspătă de fântână, până la realizarea unor norme de aplicare cuprinse între 91 și 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 și 3 bari ale echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.

