



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00423

(22) Data de depozit: 12.06.2012

(41) Data publicării cererii:  
30.05.2014 BOPI nr. 5/2014

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

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

• GYORGY EVA, STR. TOPLIȚA NR. 50,  
MIERCUREA CIUC, HR, RO;  
• MATHE ISTVAN,  
PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR. 4,  
SC. A, AP. 24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;  
• ABRAHAM BEATA, STR. CULMEI BL. 11,  
SC. C, AP. 16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;  
• LANYI SZABOLCS ȘTEFAN, STR. MIKO  
NR. 21, MIERCUREA CIUC, HR, RO

(74) Mandatar:  
HARCOV A.P.I. S.R.L.,  
STR. NICOLAE IORGA NR. 61, BL. 10E,  
SC. B, AP. 9, SFÂNTU GHEORGHE,  
JUDEȚUL COVASNA

## (54) BIOPREPARAT MICROBIAN CU EFECT BIOSTIMULANT ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

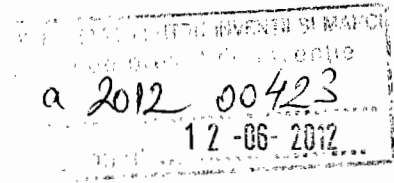
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un biopreparat microbial cu efect biostimulant, care se poate aplica pe sămânță, pe plantulă sau pe sol, constituit din două tulpini bacteriene, și la un procedeu de obținere a acestuia. Biopreparatul microbial, conform invenției, este constituit din tulpinile de bacterii care promovează creșterea plantelor *Pantoea agglomerans* G8 (număr de depozit NCAIM (P) B 001393), și tulpina *Serratia fonticola* B17 (număr de depozit NCAIM (P) B 001399), izolate din nodozitățile plantelor leguminoase de *Trefolium alpestre* L. și din țesuturile unor briofite, asociate în raport gravimetric de 1:1. Procedeu de obținere a biopreparatului microbial constă în aceea că

acesta cuprinde obținerea unui inocul prin cultivarea tulpinii *Pantoea agglomerans* G8 pe medii care conțin melasă, ca sursă de carbon, extract de porumb, sulfat de amoniu, ca surse de azot, și săruri minerale, la o temperatură de 28°C, timp de 24 h, și cultivarea tulpinii *Serratia fonticola* B17 pe medii care conțin zaharoză, ca sursă de carbon, făină de soia, ca sursă de azot, și săruri minerale, la o temperatură de 28°C, timp de 24 h, cu agitare, amestecarea celor două biomase obținute, în raport gravimetric de 1:1.

Revendicări: 2  
Figuri: 2





## BIOPREPARAT MICROBIAN CU EFECT BIOSTIMULANT SI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta inventie se refera la un biopreparat microbial compus din doua tulpini bacteriene, folosit ca biostimulant in agricultura moderna, si la procedeul de obtinere acestuia.

Multe studii au evidențiat că aplicarea bacteriilor benefice PGPR (aparținând mai multor genuri ca *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia* și *Flavobacterium*) ca biopreparate la plante poate îmbunătăți recolta cu creșterea absorbției substanțelor minerale ca azotul, fosforul, potasiul și fierul (Singh et al. 2011). Absorbția substanțelor minerale este rezultatul interacțiunii dintre sistemul radicular a plantei, mediul chimic și fizic a solului și comunitatea microbiologică a rizosferei. Aceste bacterii benefice contribuie la creșterea suprafeței a sistemului radicular prin producerea fitohormonilor, contribuind astfel la absorbția mai eficientă a elementelor nutritive. Uneori mecanismele care stau la baza creșterii plantelor nu sunt cunoscute detaliat și efectul creșterii este atribuit activității specifice a microorganismului implicat (Cummings și Orr 2011).

Biopreparatele sunt definite ca substanțe cu conținut de microorganisme vii într-un material numit suport din diferite substanțe organice, inorganice sau sintetizate, care aplicat la semințe, plante sau sol colonizează rizosfera sau interiorul țesuturile plantare și promovează dezvoltarea plantelor gazde prin creșterea aprovizionării și disponibilității elementelor nutritive primare. Biopreparatele microbiene pot substitui total sau parțial fertilizatori chimice (Vessey 2003).

Aceste biopreparate au dezavantajul ca nu prezinta efectele scontate datorita conditiilor climatice si caracteristicile abiotice prezentate de tipurile de sol formate in regiuni vulcanice.

Problema pe care o rezolva inventia este realizarea unui biopreparat microbial compus din bacterii pentru biostimularea plantelor de cultura.

Biopreparatul microbial conform inventiei este constituit din tulpina *Pantoea agglomerans* G8 si tulpina *Serratia fonticola* B17, care sunt bacterii promovatoare cresterii plantelor.

Cele doua tulpini *Pantoea agglomerans* G8 si *Serratia fonticola* B17 conform inventiei este depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numere de depozit NCAIM (P) B 001393 și NCAIM (P) B 001399.

Procedeeul de obtinere a unui biopreparat cu rol de biostimulare cu ajutorul tulpinilor bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 si *Serratia fonticola* B17 izolate din nodozitățile plantelor leguminoase *Trifolium alpestre* L. si din țesuturile unor briofite conform inventiei, consta in aceea ca, cuprinde obtinerea unui inocul, prin cultivarea tulpinii *Pantoea agglomerans* G8 pe medii care contin melasa ca sursa de carbon, extract de porumb, sulfat de amoniu ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h, si a tulpinii *Serratia fonticola* B17 pe medii care contin zaharoza ca sursa de carbon, faina de soia ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare, amestecarea celor doua biomase obtinute in raport gravimetric de 1:1, care se poate aplica pe samanta sau plantula sau sol.

Prin realizarea inventiei se obtin urmatoarele avantaje:

- prin acest invenție se dă o propunere pentru o nouă biopreparat microbial cu efect bisotimulant
- tulpinile bacteriene care stau la baza biopreparatului biostimulant sunt tulpini bacteriene autohtone
- realizarea acestei consorție bacteriană prin izolarea a două tulpini bacteriene, determinarea caracterelor de mobilizare a elementelor nutritive și stimularea prin producerii regulatorului de creștere
- prin producerea fitohormonului sistemul radicular devine mai dezvoltat contribuind la absorbția mai eficientă a nutrienților
- un nou produs în agricultura durabilă a regiunii care îmbunătățește calitățile nutritive ale plantelor
- bacteriile sunt ușor de cultivate, se multiplică rapid
- procedeeul de realizare a biopreparatului microbial cu efect biostimulant este simplu și realizata pe scară industrială

Tulpinile bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 si *Serratia fonticola* B17 folosite in procesul biotehnologic sunt izolate din nodozitățile plantelor leguminoase *Trifolium alpestre* L. si din țesuturile unor briofite si caracterizate genetic prin identificare.

Biopreparatul microbial cu efect de biostimulare s-a obtinut cu un amestec de tulpini microbiene si anume tulpina bacteriana *Pantoea agglomerans* G8 originara din nodozitățile plantelor leguminoase si *Serratia fonticola* B17 originara din țesuturile unor briofite.

Pentru mediile de cultivare, s-au folosit ca surse de carbon: melasa, zaharoza, ca surse de azot: extract de porumb, sulfat de amoniu, faina de soia. In afara de aceste materii prime, s-au folosit si saruri minerale care contin calciu, fier, potasiu, fosfor, magneziu.

Efectul biopreparatului microbial obtinut s-a studiat in vitro si la plantele de mazare, cu rezultate bune in ceea ce priveste caracterele benefice si promovarea cresterii a plantelor de mazare.

Procedeul de obtinere prin biosinteza a biopreparatelor microbial conform inventiei consta in urmatoarele.

- In prima faza se obtine cultura de preinocul prin cultivarea in flacoane cu agitare a tulpinilor de bacterii *Pantoea agglomerans* G8 si *Serratia fonticola* B17 pe medii propice fiecarui tulpini. Aceste contin surse de carbon: melasa, zaharoza, ca surse de azot: extract de porumb, sulfat de amoniu, faina de soia si saruri minerale.

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

- Faza de inocul are loc in acelasi conditii ca preinoculul sau, la un volum mai mare de mediu de cultura.

- In faza de bioproces are loc dezvoltarea si cultivarea tulpinilor bacteriene, utilizand diferite medii de cultivare ca la inocul.

- Mediile de cultura sunt diferite in functie de tulpinile bacteriene utilizate: *Pantoea agglomerans* G8 si *Serratia fonticola* B17 dar conditiile de lucru sunt aceeasi.

- Pentru obtinerea biomasei tulpinilor *Pantoea agglomerans* G8 si *Serratia fonticola* B17 temperatura de incubarea este 28 °C timp de 24 h si agitare 200 rpm.

Se prezinta in continuare un exemplu de realizare a inventiei:

*Faza1. Izolarea și identificarea bacteriilor benefice*

Pentru obținerea unor tulpini noi de bacterii biostimulante cele două tulpini bacteriene au fost izolate pe medii selective din diferite zone specifice.

*Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393

Pentru izolarea probele au fost prelevate din Munții Ciucului din nodozitățile plantelor leguminoase *Trifolium alpestre* L. Nodozitățile au fost dezinfectate cu hipoclorit de sodiu 6% timp de 10-15 minute, apoi spălate de mai multe ori cu soluție fiziologică și omogenizate într-un mojar steril cu 9 ml soluție fiziologică. Din extractul omogenizat, care conține rhizobiile a fost diseminată 0,1 ml pe suprafața mediului selectiv YEM (manitol 10 g, MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O 0.2 g, NaCl 0.1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O 0.2 g, extract de drojdie 0.01 g, agar-agar 20 g, apă distilată 1000 ml și albastru de bromtimol, pH=6.9) Din probele de sol am preparat diluții seriate, din care a fost diseminată 0,1 ml pe suprafața mediului selectiv YEM. Cutiile Petri inoculate au fost incubate la 28°C timp de 48 h.

*Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399

Pentru izolarea tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 probele au fost prelevate din rezervația naturală mlaștina Borsáros, din județul Harghita. Speciile bacteriene au fost izolate din țesuturile unor briofite autohtone. Din probele prelevate au fost pregătite diluții seriale. 50 mg de probă se dizolvă în 9 ml de ser fiziologic sterilă (soluție de clorură de sodiu 0.9 %). Din această soluție 1 ml se transferă în 9 ml de ser fiziologic (diluția 10<sup>-1</sup>). Din această diluție 1 ml se transferă din nou 1 ml în ser fiziologic, obținând astfel diluția 10<sup>-2</sup>. Din fiecare diluție 0.1 ml se transferă în medii de cultură Nutrient (peptonă 5 g, NaCl 5 g, extract de drojdie 2 g, extract de carne 1 g, agar-agar 15 g, apă distilată 1000 ml). Probele se incubează timp de 24/48 ore la 28°C. După obținerea culturilor pure, acestea sunt păstrate pe mediu de cultură Nutrient.

Caracterizarea genetică a tulpinilor bacteriene selectate respectiv clasificarea genotipică se realizează pe baza amplificării genei pentru ADNr 16S.

Tabel 1. Caracteristicile biochimice și morfologice a tulpinilor bacteriene

	<i>Pantoea agglomerans</i> G8 NCAIM P(B)001393	<i>Serratia fonticola</i> B17 NCAIM P(B)001399
<b>Colorația Gram</b>	negativă	negativă
<b>Evidențierea sp.lor</b>	negativă	negativă

Oxidarea glucozei	pozitivă	pozitivă
Oxidarea lactozei	negativă	negativă
Reducerea nitraților	pozitivă	pozitivă
Testul gelatinoliză	negativă	pozitivă
Tipul respirației	aerobă	aerobă
Producere de amoniac	pozitivă	-

Identificarea a tulpinilor bacteriene a fost realizată pe baza secvențializării fragmentului 16S rADN (Tabel 2.)

Tabel 2. Incadrarea taxonomică a tulpinilor pe baza secvențelor 16S rADN

Tulpina	Lungimea secvenței 16S rADN (perechi de baze)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN	Identificarea tulpinilor pe baza similarității secvenței 16S rADN cu tulpinile de referințe din GenBank; procentul de similaritate
G8	360	TACACATGCAAGTCGGACGGTAGCACAGA GAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGAC GGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGAT ANAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGC TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGA GGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGAT GAACCCAGATGGGATTANCTAGTAGGCGG GGTAATGGNCCACCTAGGCGACGATCCCTA GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT ATGAA	<i>Pantoea agglomerans</i> strain BBPE277471 (FJ357811.1)  - similaritate: 99,1%
B17	396	CCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAAC CCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATGG CTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATA TTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG GACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTC ATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCC TAGGTGAGCCATTACCTCACCTACTAGCTA ATCCCATCTGGGCACATCCGATGGTGTGAG GCCCCAAGGTCCCCACTTTGGTCCGAAGA CGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTA GTTATCCCCCTCCATCGGGCAGNTTCCCAG ACATTACTCACCCGTCCGCCGCTCGTCACC CAGGAGCAAGCTCCNTGTGCTACCGCTCGA CGTG	<i>Serratia fonticola</i> DSM 4576 (AJ233429)  - similaritate: 99,8%

*Faza 2. Evaluarea capacității de fixare a azotului prin metoda de reducere a acetilenei a tulpinii bacteriene Pantoea agglomerans G8 NCAIM P(B)001393*

Determinarea capacității de fixare a azotului a tulpinii bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 a fost realizată prin metoda de reducere a acetilenei.

Metoda indirectă are la bază capacitatea nitrogenazei de a reduce substraturi nefiziologice cu legătură triplă cum ar fi acetilena.

Acetilena inhibă fixarea azotului de către enzima nitrogenaza și este redusă la etilenă, care poate fi detectată cu ajutorul cromatografiei de gaze.

Izolatele de rhizobii au fost inoculate în medii lichide YMA modificat. După închiderea ermetică, 10 % a aerului a fost înlocuit cu acetilenă și incubate 24 h după care din faza gazoasă a fiolei 50 μl de amestec de gaze a fost injectat în cromatograful de gaze de tip Varian CP 3380, cu coloană de tip: WCOT FUSED SILICA, 25 M x 0,25 MM COATING CP-Sil 5 CB și detector FID.

Condițiile de funcționare a cromatografului de gaze: temperatura injectorului: 100 °C, temperatura coloanei 27°C 5 min, izotermă.

*Faza 3. Determinarea capacității de mobilizarea a fosfaților anorganici la bacteriile izolate*

Bacteriile cu capacitatea de solubilizare a fosfaților anorganici sunt selectate prin metoda inoculării pe medii nutritive Pikovskaya cu conținut de fosfat tricalcic. Mediul de cultură Pikovskaya are următoarea compoziție: extract de drojdie 0,5 g, dextroză 10 g, fosfat de calciu 5 g, sulfat de amoniu 0,5 g, KCl 0,2 g, MgSO<sub>4</sub> 0,1 g, MnSO<sub>4</sub> 0,0001 g, FeSO<sub>4</sub> 0,001 g, agar-agar 20 g, 1000 ml apă distilată.

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

Tulpinile bacteriene de 24 h au fost inoculate pe mediile Pikovskaya și incubate 48 h la 28° C.

Tulpinile bacteriene biostimulante *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 și *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 au rezultat o capacitate de solubilizare a fosfaților anorganice deosebit de mare, rezultatele fiind prezentate în Tabelul 2.

Tabel 2. Rezultatele determinării de mobilizare a fosfaților de către tulpinile bacteriene luate în studiu

Tulpina bacteriană	Diametrul zonei transparente în jurul coloniilor (mm)
<i>Pantoea agglomerans</i> G8 NCAIM P(B)001393	3,34 ± 0,02
<i>Serratia fonticola</i> B17 NCAIM P(B)001399	1,48 ± 0,05

#### Faza 4. Studiul capacității de producere a compușilor de siderofori la bacteriile izolate

Compușii de siderofori au o afinitate și specificitate mare față de ionii de fier, având rolul solubilizării fierului din complecși de fier.

Determinarea capacității de producere a compușilor de siderofori de către tulpinile bacteriene izolate a fost efectuată pe medii agarizate cu conținut de colorant de cromazurol S (CAS).

Metoda are la bază, faptul că compușii de siderofori datorită afinității lor pentru ionii de fier pot fi detectate indiferent de structura lor chimică. La complexul de fier- colorant este adăugat un ligand puternic de exemplu compuși siderofori. După formarea complexului de fier-ligand, eliberarea colorantului este însoțită de schimbarea culorii: în jurul coloniilor bacteriene dezvoltate cu capacitate de producere de siderofori, culoarea albastru devine portocaliu.

5 μl din tulpinile bacteriene de 24 h cultivate în mediul lichid Luria Bertani sau King B sunt inoculate pe mediul CAS agarizat (PIPES 6 g, NaOH 0.6 g, proteoza peptonă 15 g, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 15 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, glicerol 10 ml, 60.5 mg crom-azurol S în 50 ml de apă distilată, 10 mg FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O și 72.9 mg HDTMA în 50 ml de apă distilată, apă distilată 900 ml) și incubate 48 h la 28° C.

Cele două tulpini studiate au dat rezultat pozitiv din punct de vedere a producerii sideroforilor. Prin capacitatea producerii acestor compuși, aceste două tulpini bacteriene contribuie la mobilizarea fierului din complecși.

#### Faza 5. Determinarea capacității de producere a fitohormonului auxinic (acidul 3-indolil acetic)

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



Determinarea calitativă a producerii acidului 3-indolil acetic a fost realizat pe mediu Luria Bertani inoculate pe plăcile Petri agarizate, după care membrane de nitroceluloză de dimensiunile de 1x1 cm au fost depuse asupra coloniilor. După incubare la 28°C de 24 h, membrana de nitroceluloză a fost impregnată în reactiv Salkovski. Apărarea culorii roșie a însemnat capacitatea de producere a acidului 3-indolil acetic.

Pentru determinarea cantității a acidului 3-indolil acetic produs, tulpinile bacteriene au fost inoculate în medii lichide TSB cu conținut de triptofană de 100 μg/ml și incubate 72 h la 150 rpm. După incubare suspensiile bacteriene au fost centrifugate la 5000 rpm 15 min și 1 ml de supernatant a fost adăugat la 2 ml de reactiv Salkovski și incubat circa 25-30 min la temperatura camerei. Absorbanța soluției a fost determinată la 530 nm.

Curba de calibrare a fost realizată prin determinarea absorbanței la 530 nm a unor soluții conținând acid acetic indolil în diferite concentrații (5-, 10-, 15-, 20-, 25 μg/ml). Cantitatea acidului 3-indolil acetic produs de tulpinile bacteriene studiate a fost calculat pe baza curbei de calibrare. Cantitatea acidului 3-indolil acetic produs de către cele două tulpini bacterii studiate este prezentată în Tabelul 3.

Tabel 3. Cantitatea auxinului produs de către tulpinile bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 și *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399

<b>Tulpina bacteriană</b>	<b>Cantitatea acidului indolil acetic produs (μg/ml)</b>
<i>Pantoea agglomerans</i> G8 NCAIM P(B)001399	15,06
<i>Serratia fonticola</i> B17 NCAIM P(B)001399	13,22

#### *Faza 6. Obținerea biomasei bacteriene prin fermentație*

Pentru realizarea biomasei de *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393, tulpina bacteriană a fost cultivată în 50 ml mediu de cultură lichidă Nutrient timp de 24 h la 28 °C la 200 rpm, în baloane de 250 ml. Aceasta suspensie bacteriană de 24 h cu este aplicată pentru realizarea preinoculului.

Mediul de cultură a preinoculului conține: melasă 20 g/l, extract de porumb 30 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,05 g/l, CaCO<sub>3</sub> 0,05 g/l.

Mediul de cultură a inoculantului conține: melasă 20 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  0,2 g/l,  $\text{FeSO}_4$  0,05 g/l,  $\text{CaCO}_3$  0,05 g/l.

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

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

Densitatea celulară a tulpinii bacteriene biostimulante de *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 este de  $3,8 \times 10^9$  unități formatoare de colonii/ml în preinoculul după fermentare de 24 h.

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

Densitatea celulară a tulpinii *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 este determinată prin diseminare pe plăci agarizate după 14 h și 24 h, care după 24 h de fermentație a atins valoarea de  $2,42 \times 10^9$  UFC/ ml, iar pH ul este de  $6,6 \pm 6,7$ .

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

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

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

Mediul nutritiv industrial conține următoarele substanțe: făină de soia 25 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,25 g, zaharoză 1,25 g, apă distilată 1000 ml, sterilizat la 121 °C timp de 20 minute.

Cultura astfel obținută a fost folosit în continuare, pentru inocularea unui volum de 1 l de mediu nutritiv industrial (12,5 ml la 1 l de mediu). Cultura a fost crescută la 28° C, cu agitare de 200 rpm timp de 24 ore.

Densitatea celulară a tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 a atins 0,59 \*10<sup>10</sup> de unități formatoare de colonii CFU/ml după 24 ore de fermentare valoarea pH -ului fiind 7,3.

*Faza 7. Biotestarea in vitro a efectului benefic asupra plantelor de mazăre*

S-a testat efectul stimulant a tulpinilor bacteriene selectate, asupra plantelor de mazăre, în condiții de laborator, într-un fitotron. Solul folosit a fost sterilizat în trei zile consecutive, la 105 °C, timp de 30 minute. Semințele de mazăre sterilizate au fost germinate, timp de trei zile la 28 °C, iar plântuțele germinate au fost însămânțate în solul sterilizat. Fiecare plântuță a fost inoculat cu 1 ml de soluție bacteriană (10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/ml). Plantele de mazăre au fost crescute timp de 10 zile, într-un fitotron (25 °C, 70% umiditate relativă, durata perioadei de iluminare fiind 12 ore/zi). În cazul fiecărei experiment s-a folosit și o probă martor, în cazul căruia solul nu a fost inoculat cu bacterii. După perioada de creștere s-a măsurat biomasa proaspătă totală al plantelor, biomasa proaspătă și uscată a rădăcinii respectiv a tulpinii (uscarea la 60°C, timp de 6 ore).

În cazul studiului efectului de stimulare a celor două tulpini bacteriene asupra plantelor de mazăre putem trage concluzia că ambele specii au exercitat efect benefic. Greutatea totală a plantelor de mazăre inoculate cu tulpina bacteriană *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 a fost 1,43 g față de proba martor unde greutatea totală a fost egală cu 1,15 g. Această valoare în cazul tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 a fost 1,64 g față de martor unde greutatea totală a fost 1,57 g. Putem trage concluzia că efectul stimulant a speciei bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 este mai accentuat, care se vede și în Figurile 1. și 2. Tulpina bacteriană de *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 a promovat mai ales creșterea sistemului radicular.

Rezultatele prezentate susțin eficiența tulpinilor bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 și *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 ca promotor asupra creșterii plantelor. Conform procedeele descrise în prezenta invenție, cele două izolate bacteriene au proprietăți benefice ca mobilizarea fosfaților anorganici, producerea de siderofori și acid-acetic indoleic. Aceste proprietăți sunt demonstrate a fi însușiri benefice asupra creșterii plantelor. Proprietățile promovatoarea asupra creșterii plantelor au fost dovedite și prin studiul efectului direct a tulpinilor bacteriene asupra plantelor de mazăre.

Biopreparatul obtinut prin amestecarea celor doua biomase obtinute - tulpinilor bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM (P)B001393 și *Serratia fonticola* B17 NCAIM (P)B001399 in raport gravimetric de 1:1, ca biostimulant reprezintă o soluție alternativă pentru agricultura durabilă.

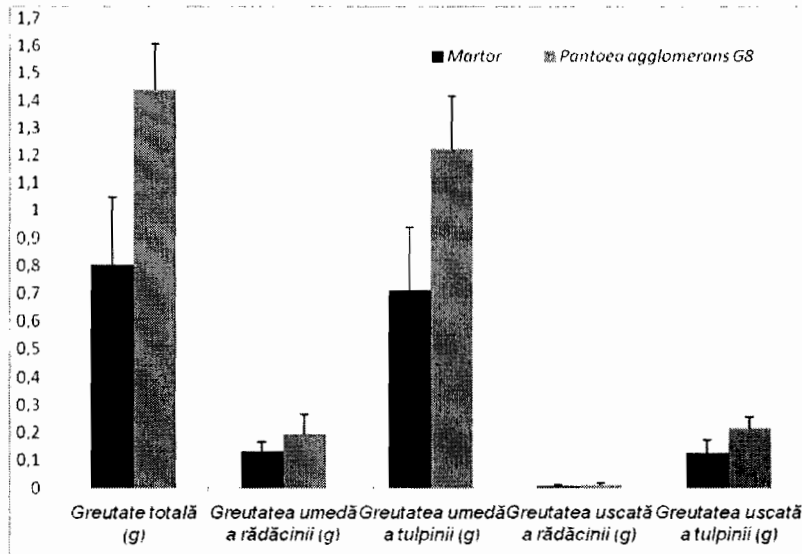
## REVENDICARI

1. Biopreparatul microbial cu efect biostimulant caracterizat prin aceea ca este compus din tulpina *Pantoea agglomerans* G8 depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numar de depozit NCAIM (P) B 001393 si tulpina *Serratia fonticola* B17 depusa la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms din Budapesta, cu numar de depozit NCAIM (P) B 001399, avand capacitatea de a promova cresterea plantelor prin mobilizarea nutrientilor si producerea de fitohormoni.

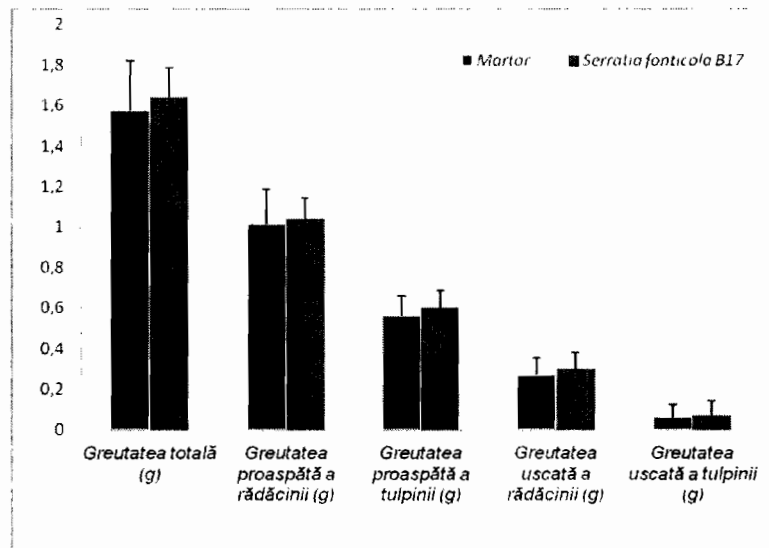
1.1 Conform revendicarii 1 tulpina *Pantoea agglomerans* G8 caracterizat prin aceea ca are capacitate de fixarea azotului atmosferic, mobilizarea fosfatiilor anorganici, producerea de siderofori si fitohormon auxinic.

1.2 Conform revendicarii 1 tulpina *Serratia fonticola* B17 are capacitate de promovare a cresterii plantei caracterizat prin aceea ca mobilizeaza fosfatii anorganici, produce siderofori si fitohormon auxinic.

2. Procedeu de obtinere a unor produse biologice active cu rol de biostimulare caracterizat prin aceea ca aceasta cuprinde fazele cultivarii tulpinii *Pantoea agglomerans* G8 pe medii care contin melasa ca sursa de carbon, extract de porumb, sulfat de amoniu ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h, si a tulpinii *Serratia fonticola* B17 pe medii care contin zaharoza ca sursa de carbon, faina de soia ca surse de azot si saruri minerale la o temperatura de 28°C timp de 24 h cu agitare, amestecarea celor doua biomase obtinute in raport gravimetric de 1:1, care se poate aplica pe samanta sau plantula sau sol.



**Figura 1.** Efectul inoculării a tulpinii bacteriene *Pantoea agglomerans* G8 NCAIM P(B)001393 asupra parametrilor biometrici față de proba martor



**Figura 2.** Efectul inoculării a tulpinii bacteriene *Serratia fonticola* B17 NCAIM P(B)001399 asupra parametrilor biometrici față de proba martor