



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2007 00757**

(22) Data de depozit: **02.11.2007**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.12.2010** BOPI nr. **12/2010**

(41) Data publicării cererii:

29.05.2009

BOPI nr. **5/2009**

(73) Titular:

• **INSTITUTUL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
PLANTELOR,**

**BD ION IONESCU DE LA BRAD, NR. 8,
SECTOR 1, OP 18, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI, NR. 5,
BL. D7, SC. E, ET. 2, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DINU SORINA,**

**BD ION IONESCU DE LA BRAD, NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

US 6610531, 2006/0150488

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A BIOPREPARATELOR AGROINOCULANTĂ CU BACTERII ÎN STARE DE DORMANȚĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere de biopreparate agroinoculante, cu bacterii în stare de dormanță. Procedul conform invenției cuprinde etapele: de realizare a unui mediu de cultură cu conținut de ape glicerinoase, plasmolizat de drojdie, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, Zn:glicerol (1:4) și apă; de sterilizare a mediului de cultură la 121°C, timp de 30 min; de răcire la temperatura de regim specifică fiecărui microorganism, și de inoculare a mediului de cultură; de dezvoltare a culturii de bacterii timp de 72 h, la temperatura optimă fiecărui microorganism, pe mediu aerat și agitat;

de recoltare a biomasei de bacterii, urmată de amestecarea acestora cu hidrogel superadsorbant, pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu; gonflarea timp de 30 min a hidrogelului în suspensia de bacterii; adăugarea peste amestecul de hidrogel gonflat- suspensie de bacterii a unei soluții de trehaloză 1M; amestecarea energetică, cu omogenizare, a hidrogelului și uscarea prin pulverizare a amestecului de bacterii.

Revendicări: 2



RO 123144 B1

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui biopreparat agroinoculant, care conține proteobacterii trecute în stare de activitate metabolică lentă (dormanță). Aceste proteobacterii sunt microorganisme utile plantelor de cultură.

Sunt cunoscute mai multe procedee de obținere a biopreparatelor inoculante cu bacterii în stare de dormanță. Brevetul **US 4875921** descrie un procedeu în care bacteriile recoltate de pe suprafața unui mediu agarizat sunt amestecate cu un suport chimic inert granular (perlită 0,5...1,0 părți la 1 parte biomasă bacteriană, cărbune activ 1 parte la 1 parte biomasă bacteriană) și zaharoză 1 parte (în cazul folosirii cărbunelui activ), după care sunt supuse uscării lente în condiții aseptice, la o temperatură apropiată de cea a camerei. Fages J., 1990, "An optimized process for manufacturing an Azospirillum inoculant for crops", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 473-478, descrie un procedeu care este o variantă a trapării în gel de alginat, procedeu care implică următoarele etape: (i) creșterea bacteriilor inoculante (*Azospirillum*) pe bulion nutritiv; (ii) adăugare de alginat de sodiu, împreună cu alte ingrediente, peste suspensia de bacterii în mediul de cultură; (iii) extrudarea amestecului sub presiune printr-o duză din plastic de 1 mm, picăturile rezultate fiind proiectate într-o soluție de CaCl_2 6%, formându-se granule de alginat care conțin bacterii trapate; (iv) separarea bacteriilor de soluția de clorură de calciu și (v) uscarea granulelor în condiții blânde (temperaturi de maximum 37°C).

Aceste procedee sunt evident dificil de realizat la scară industrială, necesitând timp și forță de muncă calificată.

În ultimii ani, au fost realizate o serie de procedee care utilizează proprietățile trehalozei, de asigurare a creșterii ratei de supraviețuire la uscare. Brevetul **US 6610531** descrie un procedeu de obținere a bacteriilor uscate, viabile, în prezența trehalozei și a cationilor divalenți. Întrucât structura vitroasă, formată de trehaloză, prin uscare reduce semnificativ nu numai viteza reacțiilor de degradare asociate uscării, dar și pe cea a reacțiilor de rehidratare, necesare pentru revenirea bacteriilor în stare activă (capsulele sticloase, formate în jurul bacteriilor, prin uscarea trehalozei, fiind rezistente inclusiv la acțiunea unor solvenți organici, ca acetona sau cloroformul - se citează aici lucrarea Manzanera M., Vilches S., Tunnacliffe A, 2004, "Plastic encapsulation of stabilised *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*", *Appl. Env Microbiol.*, 70, 3143-3145), procedeul propus pentru uscare s-a limitat a fi doar o alternativă ieftină la procedeul de uscare prin liofilizare. Pentru obținerea de inoculanți trehaloză (ca și zaharoză), au fost folosite, pentru producerea unor inoculanți lichizi, parțial deshidratați (cererea de brevet **US 2006/0150488**), dar agroinoculanții astfel realizați nu au avantajele de stabilitate și de simplitate în manipulare ale inoculanților în stare uscată.

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în realizarea unui procedeu de obținere a biopreparatelor cu bacterii în stare de dormanță, care să fie ușor de ridicat la scară și care să asigure formarea unui produs sub formă de pulbere granulară, din care bacteriile să-și revină rapid în starea activă metabolic, la introducerea în sol, împreună cu semințele plantelor de cultură.

Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că se realizează un mediu de cultură pe bază de ape glicerinoase, cu următoarea compoziție: 58...62 părți ape glicerinoase 10% s.u., 1,4...1,6 părți plasmolizat de drojdie, 0,14...0,16 părți K_2HPO_4 , 0,14...0,16 părți $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015...0,025 părți CaCl_2 , 0,02...0,03 părți Zn: glicerol (1: 4) și apă până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă, se sterilizează mediul de cultură la 121°C, timp de 30 min, se răcește la temperatura de regim specifică fiecărui microorganism, se inoculează mediul de cultură, se lasă cultura de bacterii să se dezvolte timp de 72 h, la temperatura optimă fiecărui microorganism, pe mediul aerat și agitat, se recoltează biomasa de bacterii prin centrifugare și se reia biomasa într-un volum

RO 123144 B1

reduc de supernatant, respectiv, 1 parte de biomasă în 10 părți mediu de cultură epuizat, separat prin centrifugare, ca supernatant, se amestecă biomasă de bacterii cu hidrogel superadsorbant, pe bază de poli(acril)amidă și poli(acril)at de potasiu, în proporție de 1 parte de hidrogel la 100 părți suspensie, hidrogelul se gonflează timp de 30 min în suspensia de bacterii, se adaugă, peste amestecul de hidrogel gonflat, o soluție formată din 1 parte soluție de trehaloză 1 M la 19...19,5 părți suspensie bacteriană în amestec cu hidrogel, se amestecă energic pentru omogenizarea hidrogelului, cu ajutorul unui turbomixer, se usucă prin pulverizarea amestecului de bacterii în mediul de cultură, la o temperatură a agentului de uscare, la intrare, de 120...140°C și, la ieșire, de 70...75°C.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- este ușor de industrializat, pentru că toate etapele, inclusiv cea de uscare, sunt ușor de ridicat la scară, existând utilaje specifice de diferite capacități;

- se asigură protejarea bacteriilor care sunt supuse procesului de uscare, atât datorită creșterii pe un mediu care determină acumularea de trehaloză intercelulară (mediu ușor hiperosmotic și nivel ridicat de zinc, care determină o supraexprimare a genelor implicate în acumularea de trehaloză), cât și adăugării de trehaloză în mediul din afara celulelor bacteriene;

- permite formarea unei pulberi granulare, din care bacteriile să-și revină rapid în starea activă metabolic, la introducerea în sol, împreună cu semințele plantelor de cultură;

- se asigură reproductibilitatea produsului final de bioconversie, datorită unui produs inițial cu o reproductibilitate mărită;

- se realizează bioconversia unui produs excedentar (ape glicerinoase) într-un produs destinat unei utilizări durabile în agricultură (protecția/nutriția biologică a plantelor cultivate).

Procedeul de obținere a unui biopreparat agroinoculant, care conține proteobacterii trecute în stare de activitate metabolică lentă (dormanță), care sunt folosite ca ingredient activ al biopreparatelor agroinoculante, care sunt microorganisme utile plantelor de cultură care se dezvoltă în rizosfera plantelor rezultate din semințele inoculate, și care, datorită acțiunii complexe a acestora (de nutriție, protecție și stimulare a plantelor de cultură și/sau de formare a structurii solului), asigură un nivel de producție agricolă ridicat, cu efecte minime asupra mediului și lanțului alimentar.

Procedeul de obținere a biopreparatelor agroinoculante cu bacterii în stare de dormanță constă din următoarele etape:

- realizarea unui mediu de cultură pe bază de ape glicerinoase, cu următoarea compoziție: 58...62 părți ape glicerinoase 10% s.u., 1,4...1,6 părți plasmolizat de drojdie, 0,14...0,16 părți K_2HPO_4 , 0,14...0,16 părți $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,015...0,025 părți $CaCl_2$, 0,02...0,03 părți Zn: glicerol (1: 4) și apă până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă;

- sterilizarea mediului de cultură la 121°C, timp de 30 min;

- răcirea la temperatura de regim specifică fiecărui microorganism și inocularea mediului de cultură;

- dezvoltarea culturii de bacterii, timp de 72 h, la temperatura optimă fiecărui microorganism, pe mediu aerat și agitat;

- recoltarea biomasei de bacterii prin centrifugare și reluarea biomasei într-un volum redus de supernatant, respectiv, 1 parte de biomasă în 10 părți mediu de cultură epuizat separat, ca supernatant, prin centrifugare;

- amestecarea biomasei de bacterii cu hidrogel superadsorbant, pe bază de poli(acril)amidă și poli(acril)at de potasiu, în proporție de 1 parte de hidrogel la 100 părți suspensie;

RO 123144 B1

1 - gonflarea, timp de 30 min, a hidrogelului, în suspensia de bacterii;
- adăugarea, peste amestecul de hidrogel gonflat - suspensie de bacterii, a unei
3 soluții de 1 M de trehaloză, 1 parte soluție de trehaloză la 19...19,5 părți suspensie bacteriană în amestec cu hidrogel;
5 - amestecarea energetică, cu omogenizarea hidrogelului cu ajutorul unui turbomixer;
- uscarea, prin pulverizare, a amestecului bacterii (în mediu de cultură), la o temperatură de 120...140°C, la intrarea agentului de uscare și 70...75°C, la ieșirea agentului de uscare.

9 Se prezintă, în continuare, 2 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Se iau 1000 ml de ape glicerinoase, rezultate de la producerea de acizi
11 grași prin hidroliza continuă a grăsimilor animale cu abur de înaltă presiune, se tratează cu hidroxid de potasiu 1 N, pentru a se aduce pH-ul la valoarea 6,4...6,8 upH, se termostatează
13 la 20°C, se adaugă un coagulant pe bază de amidon modificat (ca de exemplu N-Sight A1, produs de Alco Chemicals), cantitate echivalentă la 50 mg ingredient activ, se omogenizează, se așteaptă 15 min. Se filtrează apele glicerinoase pe un filtru Buchner, legat la un
15 vas Kitasato. Pe filtrul Buchner se depune, în prealabil, o masă filtrantă de 10 g, constituită
17 din 1 parte cărbune activ și 2 părți perlită (ca de exemplu o masă filtrantă din produse comerciale Acticarbone 1 parte și Clarcel-Flo 2 părți, părțile fiind exprimate în greutate;
19 Acticarbone și Clarcel-Flo sunt mărci înregistrate ale grupului Arkema). În filtrat, se determină substanța uscată refractometric și apoi se procedează la normalizarea conținutului de
21 substanță uscată în filtrat la 10%, prin diluarea corespunzătoare cu apă distilată. Într-un bioreactor de multiplicare, confecționat din oțel inoxidabil, cu următoarele caracteristici: volum
23 util 15 l, volum total 25 l, presiune de lucru: 0,5 bari maximum, presiune de sterilizare: 1,5 bari, presiune de testare: 3,5 bari, temperatura de lucru: 25...35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), pH de lucru:
25 3,5...9,5 upH, (menținere automată), aerare și agitare variabilă (5...100 rpm) ($\pm 5\%$), se prepară 15 l de mediu de cultură, care include în compoziția sa: 58...62 părți ape glicerinoase
27 10% s.u., 1,4...1,6 părți plasmolizat de drojdie, 0,14...0,16 părți K_2HPO_4 , 0,14...0,16 părți $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015...0,025 părți CaCl_2 , 0,02...0,03 părți Zn: glicerol (1:4) și apă până la
29 1000 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă. Bioreactorul se sterilizează, împreună cu mediul de cultură (30 min la 1 at) și apoi se răcește. Atunci când temperatura atinge 30°C,
31 se inoculează bioreactorul cu 0,5 l suspensie de bacterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *leguminosarum*, tulpina FL400, cu proprietăți de fixare a azotului în simbioză cu rădăcinile
33 de fasole și de stimulare a creșterii plantelor din familia *Brassicaceae*. Se pornește biosinteza prin aerare cu 0,75...1,0 l aer/l mediu/min. Se dezvoltă cultura de bacterii, timp de 72 h, la
35 temperatura optimă de 30°C, pe mediu aerat cu 0,75...1,0 l aer/l mediu/min și agitat.

Se recoltează bacteriile prin centrifugare (5000 g, 15 min). Biomasa umedă depusă
37 prin centrifugare (190 g) se reia într-un volum redus de supernatant, respectiv, 1 g de biomasă în 9 g mediu de cultură epuizat (separat ca supernatant prin centrifugare). Se amestecă
39 biomasa de bacterii cu hidrogel superadsorbant, pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu, în proporție de 1 g de hidrogel la 100 g suspensie, peste cele 1900 g de
41 suspensie, adăugându-se 19 g hidrogel. Hidrogelul se lasă cu suspensia bacteriană timp de 30 min, pentru a se gonfla, și apoi se adaugă, peste amestecul de hidrogel gonflat, 100 g
43 soluție de trehaloză 1 M. Se amestecă energetic cu un turbomixer cu cuțite de inox, iar amestecul bacterii - hidrogel - trehaloză se deshidratează prin uscare prin pulverizare, la o
45 temperatură de 120...140°C, la intrarea agentului de uscare, și 70...75°C, la ieșirea agentului de uscare.

RO 123144 B1

Plasmolizatul de drojdie se prepară după cum urmează: 500 părți drojdie pentru panificație (STAS 985-79, 26% substanță uscată) se emulsionează cu 2400...2500 părți apă, se menține 30 min la 70...75°C, se sterilizează 20 min la 105°C, se răcește la 30...35°C, se tratează cu 0,08...0,1 părți metabisulfid de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), se menține 30 min la 65...70°C, se omogenizează la presiune medie (150...200 bari) și se deshidratează prin atomizare la temperatură joasă (130...140°C, la intrarea agentului de uscare, 70...75°C, la ieșirea agentului de uscare).

Complexul Zn/glicerol utilizat este preparat după cum urmează: 30 g de acetat de zinc hidratat, $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 52 g de glicerol (4 echivalenți) sunt încălzite într-un balon cu fundul plat de 500 ml, la 120°C, pe baie de ulei (110°C temperatura internă). Amestecul este agitat mecanic cu un turbomixer cu cuțit de inox. După menținere trei ore la 120°C, amestecul este răcit și centrifugat la 4500 rpm, pentru 30 min. Supernatantul clar este înlăturat, iar sedimentul alb este reluat în izopropanol și resuspendat. În final, se aduce la 100 ml cu izopropanol, se filtrează prin pâlnie din sticlă sinterizată și se readuce din nou la cotel de 100 ml. Soluția rezultată se evaporă la sec, iar reziduul este reluat cantitativ și cântărit.

Exemplul 2. Se iau 1000 ml de ape glicerinoase, rezultate de la producerea de biodiesel prin transesterificare cu alcool metilic (după recuperarea alcoolului metilic, cu un conținut mai mic de 0,2% metanol), se tratează cu acid clorhidric 1 N, pentru a se aduce pH-ul la valoarea 6,4...6,8 upH, se termostatează la 20°C, se adaugă un coagulant pe bază de amidon modificat (ca de exemplu N-Sight A1, produs de Alco Chemicals), cantitate echivalentă la 50 mg ingredient activ, se omogenizează, se așteaptă 15 min. Se filtrează apele glicerinoase pe un filtru Buchner, legat la un vas Kitasato. Pe filtrul Buchner se depune, în prealabil, o masă filtrantă de 10 g, constituită din 1 parte cărbune activ și 2 părți perlită (ca de exemplu o masă filtrantă din produse comerciale Acticarbene 1 parte și Clarcel-Flo 2 părți, părțile fiind exprimate în greutate; Acticarbene și Clarcel-Flo sunt mărci înregistrate ale grupului Arkema). În filtrat, se determină substanța uscată refractometric și apoi se procedează la normalizarea conținutului de substanță uscată în filtrat la 10%, prin diluarea corespunzătoare cu apă distilată. Într-un bioreactor de multiplicare, confecționat din oțel inoxidabil, cu următoarele caracteristici: volum util 15 l, volum total 25 l, presiune de lucru: 0,5 bari maximum, presiune de sterilizare: 1,5 bari, presiune de testare: 3,5 bari, temperatura de lucru: 25...35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), pH de lucru: 3,5...9,5 upH (menținere automată), aerare și agitare variabilă (5...100 rpm) ($\pm 5\%$), se prepară 15 l de mediu de cultură, care include în compoziția sa: 58...62 părți ape glicerinoase 10% s.u., 1,4...1,6 părți plasmolizat de drojdie, 0,14...0,16 părți K_2HPO_4 , 0,14...0,16 părți $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015...0,025 părți CaCl_2 , 0,02...0,03 părți Zn: glicerol (1: 4), apă până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă. Bioreactorul se sterilizează, împreună cu mediul de cultură (30 min la 1 at) și apoi se răcește.

Atunci când temperatura atinge 35°C, se inoculează bioreactorul cu 0,5 l suspensie de bacterii *Azospirillum brasiliense*, tulpina Sp001, favorizant diazotrof al creșterii plantelor de cultură (fixator de azot asociativ, cu capacitate de producere *in situ* de fitohormoni). Se pornește biosinteza prin aerare cu 0,8...0,9 l aer/l mediu/min. Se dezvoltă cultura de bacterii timp de 72 h, la temperatura optimă de 35°C, pe mediu aerat cu 0,8...0,9 l aer/l mediu/min și agitat.

Se recoltează bacteriile prin centrifugare (5000 g, 15 min). Biomasa umedă depusă prin centrifugare (270 g) se reia într-un volum redus de supernatant, respectiv, 1 g de biomasă în 9 g mediu de cultură epuizat (separat ca supernatant prin centrifugare). Se amestecă biomasa de bacterii cu hidrogel superadsorbant, pe bază de poliacrilamidă și poliacrilat de potasiu, în proporție de 1 g de hidrogel la 100 g suspensie, peste cele 2700 g

RO 123144 B1

de suspensie, adăugându-se 27 g hidrogel. Hidrogelul se lasă cu suspensia bacteriană timp de 30 min, pentru a se gonfla, și apoi se adaugă peste amestecul de hidrogel gonflat 140 g soluție de trehaloză 1 M. Se amestecă energic cu un turbomixer cu cuțite de inox, iar amestecul bacterii - hidrogel - trehaloză se deshidratează prin uscare prin pulverizare, la o temperatură de 120...140°C, la intrarea agentului de uscare, și 70...75°C, la ieșirea agentului de uscare.

Plasmolizatul de drojdie și complexul zinc glicerol, folosite în acest exemplu, se prepară ca mai sus.

Pentru a se verifica păstrarea activității biologice a tulpinilor de bacterii eliberate din biopreparatul agroinoculant, realizat prin procedeul descris mai sus, s-au realizat următoarele experimente.

În primul experiment, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, tulpina FL400, a fost cultivată în aceleași condiții precum cele descrise în exemplul 1, pe mediul OKA3: 0,15 g K_2HPO_4 , 0,15 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 g $CaCl_2$, 1,5 g autolizat de drojdie, 92,6 ml apă glicerinoasă 10% (0,96%) și 907,4 ml apă distilată.

Biomasa de rhizobii a fost apoi inoculată pe semințe de fasole (*Phaseolus vulgaris*, ev. *Diva*), corespunzător unui nivel de inocul de 10^6 ufc pe bob de fasole. În paralel, s-a realizat o inoculare a boabelor de fasole cu biopreparat granular (1 g de biopreparat la 1000 g de fasole boabe). Semințele inoculate au fost însămânțate în ghivece de 1 l, cu 0,2 kg de amestec preluvosol brun-roșcat: nisip 3: 1. Amestecul a fost adus la 80% din capacitatea de reținere a solului pentru apă (SR ISO 11274: 2001) și menținut zilnic la 80% din capacitatea de reținere, prin udare corespunzătoare cu apă distilată. Plantele de fasole rezultate au fost crescute până în fenofaza de apariție a primordiilor celui de-al doilea etaj de frunze trifoliolate, când s-au recoltat rădăcinile, în care s-a determinat activitatea nitrogenazică (acetilenreductază).

Spălarea rădăcinilor s-a efectuat deasupra unei site cu ochiuri mai mici de 0,25 mm, pentru a se recupera eventualele nodozități desprinse prin spălare.

Nodozitățile radiculare, proaspăt recoltate de pe fiecare plantă, au fost cântărite cu precizie (± 1 mg) și au fost repartizate în două părți egale. O primă parte a fost introdusă imediat într-un flacon din sticlă brună, de 1000 ml, prevăzut cu dop din cauciuc, fixat cu dop metalic înșurubat (flacon vaccin), care conține 25 ml soluție glucoză 1% în tampon TRIS-HCl pH=7,4 și acetilenă la o presiune parțială de 0,1 at. Presiunea parțială de acetilenă s-a realizat prin injectarea a 100 ml acetilenă într-un flacon de 1000 ml, cu ajutorul unei seringi de 10 ml, prin dopul din cauciuc al flaconului.

Incubarea s-a efectuat timp de 4...8 h, la temperatura de 20°C. La terminarea perioadei de incubare, din flacoanele vaccin s-au prelevat volume bine determinate de gaz, cu ajutorul unor microsiringi, prin dopul din cauciuc al flaconului. Probele de gaz s-au injectat în injectorul unui gaz-cromatograf, în capul unei coloane cromatografice de 1,5...2 x 2...2,5 m, umplută cu Porapak N și menținută la 50°C. S-a utilizat azotul ca gaz purtător, iar detectarea etenei și a acetilenei s-a făcut cu ajutorul unui detector de ionizare în flacără.

S-a lucrat cu debite de eluție cuprinse între 20 și 25 ml/s azot, iar debitele de operare ale detectorului de ionizare în flacără au fost de 10...15 ml H_2 și 5...10 ml aer. S-a efectuat în prealabil determinarea timpilor de retenție pentru etenă și acetilenă, și a înălțimii picurilor cromatografice la concentrația etalon de etenă. În condițiile experimentale de mai sus, timpul de retenție pentru etenă a fost cuprins între 65 și 75 s, iar cel pentru acetilenă între 120 și 140 s. Limita de sensibilitate a detectorului de ionizare în flacără este de peste 10...12 moli C_2H_2 , la atenuarea minimă, deci s-au realizat concentrații etalon pentru C_2H_2 , cuprinse între 10^{-4} moli și 10^{-12} moli. În general, s-a utilizat o concentrație etalon de 10^{-5} moli etenă.

RO 123144 B1

Rezultatele obținute în cadrul acestui experiment sunt prezentate în tabelul 1. Aceste date dovedesc păstrarea calității biologice de agroinoculant a bacteriilor supuse procedurii descris mai sus.

Tabelul 1

Influența procedurii descris în exemplul 1 asupra calității biologice a bacteriilor *R. leguminosarum* bv. *leguminosarum* FL400

Varianta experimentală	Activitate acetilen-reductază (μmol etenă)	Activitate acetilen-reductază specifică (μmol etenă/g nodozității)
Martor neinoculat	3,5	58,7
Inoculat 10 ⁶ ufc pe bob de fasole	19,2	238,5
Inoculat 1 g produs rezultat, conform procedurii din exemplul 1, la 1000 g boabe	18,4	207,2
DL 5%	0,82	21,7

Pentru a se testa păstrarea activității biologice a tulpinilor de *Azospirillum*, după cultivare conform procedurii, s-a realizat un alt experiment. Bacteriile au fost cultivate pe mediul OKD3: 0,15 g K₂HPO₄, 0,15 g MgSO₄·7H₂O, 0,02 g CaCl₂, 1,5 g autolizat de drojdie, 92,6 ml apă glicerinoasă 10% (0,96%) și 907,4 ml apă distilată.

Bacteriile *Azospirillum* sunt rizobacterii diazotrofe, favorizante ale creșterii și dezvoltării vegetale (PGPR - eng. "plant growth promoting rhizobacteria"), cu o acțiune complexă asupra plantelor de cultură. Unele din efectele produse în țesuturile vegetale și, în special, în cele radiculare sunt datorate producerii de fitohormoni *in situ*, de către microorganisme din genul *Azospirillum*. Pentru a se testa păstrarea calității biologice, s-a realizat un biotest de evidențiere a activității fitohormonilor giberelici produși de bacterii utile plantelor de cultură din genul *Azospirillum*.

Evidențierea și estimarea activității fitohormonilor giberelinici s-a efectuat prin biotestul inducerii α-amilazei din endospermul de orz, cuplat cu tehnica difuziei radiale în gel.

Etapele procedurii utilizate sunt:

- inducerea biosintezei α-amilazei în endospermul boabelor de orz de către fitohormonii prezenți în extractele de testat;
- difuzia radială, în gelul de agar-amidon, a enzimelor sintetizate sub acțiunea fitohormonilor și hidroliza consecutivă a amidonului;
- evidențierea zonei de acțiune a enzimei prin colorarea substratului.

Reactivii folosiți în cadrul acestui test sunt descriși mai jos.

1. Gel de agar-amidon. În 100 ml tampon substrat, pH 6,9, diluat cu 100 ml apă, se dizolvă, la cald, 2,5 g agar și 1 g de amidon, se fierbe până devine limpede.

2. Soluție tampon substrat, pH 6,9, 590 mg acetat de sodiu + 1,47 g veronal sodic + 1,4 g NaCl + 780 mg CaCb se dizolvă în apă distilată, apoi se adaugă 62 ml HCl 0,1 N și se aduce la un volum final de 250 ml cu apă distilată.

3. Soluție de dezvoltare: 45 ml iod 0,1 N cu 55 ml etanol absolut.

4. Extract de biopreparat realizat conform schemei anexate.

Materialul biologic utilizat este prezentat în cele ce urmează.

1. Bioprodus pe bază de bacterii utile din genul *Azospirillum*.

2. Endosperm de orz. Se obține din boabe de orz, care se curăță de palee și cărora li se înlătură prin tăiere partea care conține embrionul.

RO 123144 B1

- 1 Modul de lucru implică următoarele etape:
- 3 - depunerea unui gel de agar-amidon în grosime de 2...3 mm pe suport reprezentat de folii de acetat de celuloză sau lamele microscopice;
 - 5 - practicarea în gel a unor godeuri cu diametrul de 3 mm;
 - 7 - depunerea în godeuri a endospermului de orz (jumătate de bob fără embrion) și a extractului de testat;
 - 9 - incubarea 72 h la temperatura camerei, în incintă umedă;
 - 11 - colorarea cu soluție de dezvoltare a gelului;
 - 13 - măsurarea zonei de difuzie.

Fitohormonii giberelinici au fost extrași din bioproduct de cultură prin dializă inversă. Suspensia de biomasă obținută prin centrifugare (7500 g, 30 min), după cultivare conform procedurii, este reluată în tampon fosfat salin (1:1), este re-centrifugată, iar supernatantul este concentrat, trecut într-un sac de dializă și supus extracției în acetat de etil (dializă inversă).

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Media diametrelor zonelor de difuzie ale enzimelor giberelice induse ale diferitelor tulpini utile din genul *Azospirillum*

Varianta experimentală	Media diametrelor zonelor de difuzie (mm)	Concentrație GA ₃ (ng/ml)
GA3 standard (300 ng/ml)	26,6	300
Bacterii cultivate pe OK ₃	22,2	254,4
Biopreparat conform exemplului 2	24,6	216,5
Martor netratat	1,2	10,5

Aceste rezultate demonstrează faptul că se păstrează calitatea biologică a tulpinilor de *Azospirillum*, după cultivare conform procedurii descris în exemplul 2.

1. Procedeu de obținere a biopreparatelor agroinoculante cu bacterii în stare de dormanță, **caracterizat prin aceea că** se realizează un mediu de cultură, pe bază de ape glicerinoase, cu următoarea compoziție: 58...62 părți ape glicerinoase 10% s.u., 1,4...1,6 părți plasmolizat de drojdie, 0,14...0,16 părți K_2HPO_4 , 0,14...0,16 părți $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,015...0,025 părți $CaCl_2$, 0,02...0,03 părți Zn: glicerol (1:4) și apă până la 1000 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă, se sterilizează mediul de cultură la 121°C, timp de 30 min, se răcește la temperatura de regim specifică fiecărui microorganism, se inoculează mediul de cultură, se lasă cultura de bacterii să se dezvolte, timp de 72 h, la temperatura optimă fiecărui microorganism, pe mediul aerat și agitat, se recoltează biomasa de bacterii prin centrifugare și se reia biomasa într-un volum redus de supernatant, respectiv, 1 parte de biomasă în 10 părți mediu de cultură, epuizat separat, prin centrifugare, ca supernatant, se amestecă biomasa de bacterii cu hidrogel superadsorbant, pe bază de poli(acrilamidă și poli-acrilat de potasiu, în proporție de 1 parte de hidrogel la 100 părți suspensie, hidrogelul se gonflează timp de 30 min în suspensia de bacterii, se adaugă, peste amestecul de hidrogel gonflat, o soluție formată din 1 parte soluție de trehaloză 1 M la 19...19,5 părți suspensie bacteriană în amestec cu hidrogel, se amestecă energic, pentru omogenizarea hidrogelului, cu ajutorul unui turbomixer, se usucă prin pulverizarea amestecului de bacterii în mediul de cultură, la o temperatură a agentului de uscare, la intrare, de 120...140°C și, la ieșire, de 70...75°C.
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** bacteria este aleasă dintre cele fixatoare de azot în simbioză cu leguminoasele *Rhizobium leguminosarum* bv. *leguminosatum* sau asociate sistemului radicular *Azospirillum brasiliense*.

