



MD 1254 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1254<sup>(13)</sup> G2  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C 05 F 11/08;  
C 12 N 1/20

(12) **BREVET DE INVENTIE**

(21) Nr. depozit: 98-0051 (22) Data depozit: 1998.02.20	(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 1999.06.30, BOPI nr. 6/99
(71) Solicitant: Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	
(72) Inventatori: Onofraș Leonid, MD; Bolocan Galina, MD; Mohova Tatiana, MD; Todiraș Vasile, MD; Zuza Nuvela, MD; Prisacari Svetlana, MD	
(73) Titular: Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	

(54) Tulpină de bacterii de nodozități de lucernă *Rhizobium meliloti* utilizată  
în calitate de fixator simbiotic de azot

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie și poate fi  
utilizată în agricultură.

Esența invenției constă în izolarea tulpinii de  
bacterii de nodozități de lucernă *Rhizobium  
meliloti*, care se utilizează pentru tratarea  
semințelor de lucernă.

Tulpina se păstrează în Colecția Națională de  
Microorganisme a Institutului de Microbiologie al

2  
Academiei de Științe a Republicii Moldova cu  
numărul CNM RB-03.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea  
fixării simbiotice de azot.

Revendicări: 1

## MD 1254 G2

3

### Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi folosită în fitotehnie.

Este cunoscut faptul că la lucernă se folosesc îngrășăminte biologice de tipul Rizotorfin, Rizolignin etc. [1, 2].

5 De asemenea este cunoscută tulpina de bacterii de nodozități *Rhizobium meliloti* 425a, pe baza căreia se produce preparatul biologic cu capacitate de fixare a azotului atmosferic în simbioză cu plantele de lucernă [3].

Dezavantajul tulpinii ce se folosește la producerea preparatului biologic este că activitatea ei de a fixa azotul atmosferic este scăzută și instabilă, iar productivitatea plantelor este joasă.

10 Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea productivității plantelor și ameliorarea calității masei verzi a lucernei.

Esența invenției constă în propunerea unei bacterii de nodozități *Rhizobium meliloti* CNM RB-03 pentru producerea preparatului biologic, care are o activitate de fixare a azotului atmosferic mai înaltă, roada și calitatea masei verzi mai sporite față de tulpina analoagă *Rhizobium meliloti* 425a.

15 Problema dată se rezolvă prin utilizarea tulpinii de bacterii *Rhizobium meliloti* izolate din nodozități mari de culoare roz colectate de pe rădăcini de lucernă soiul Meiotnenscaia cultivată pe cernoziom podzolit nisipo-argilos din zona de nord a Republicii Moldova. Bacteriile au fost izolate conform metodei propuse de L. M. Dorosinski, ce constă în următoarele: nodozitățile se spală bine în apă curgătoare, apoi se pun în cutii de porțelan pentru 1 min în alcool etilic de 95%, după aceasta se introduc în soluție clorură de mercur ( $\text{HgCl}_2$ ) și iarăși în alcool etilic de 95%. Nodozitățile după fiecare procedură se spală bine cu apă sterilă.

După efectuarea acestor procese în condiții aseptice, nodozitățile se pun în eprubete cu câte 2 ml apă sterilă și cu un bețișor de sticlă steril se strivesc bine până când se obține o suspensie omogenă. Din aceasta se fac însămânțări pe suprafața mediului agarizat în cutii Petri.

25 Tulpina se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme (CNM) a Institutului de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova cu nr. CNM RB-03.

Rezultatul tehnic: tulpina propusă formează un sistem rizobio-radicular mai activ decât la tulpina cunoscută anterior.

Particularitățile morfologice culturale:

30 Dimensiunile celulelor culturii de 3 zile pe geloză de fasole sunt de 0,8...1,6 x 0,5...0,7 μm și celulele au formă de bastonașe, mobile, cu creștere rapidă, gram negative. La maturizare își pierd mobilitatea și formează bacterioizi ramificați. Coloniile sunt rotunde, netede, strălucitoare, albe-surii.

Particularitățile fiziologice biochimice:

35 Aerobă. Mezofilă. Temperatura optimă pentru dezvoltare 26...28°. Aciditatea optimă pH 6,8-7,0. Laptele cu lacmus nu se peptonizează. Activ asimilează glucoza, maltoza, zaharoza, lactoza. Amidonul nu se hidrolizează. Crește bine pe mediile cu azotat de sodiu, cu sărurile de amoniu.

Indicii tulpinii sunt stabili. Tulpina nu este patogenă. Se păstrează la temperatura de +4...+5°C pe mediu nutritiv cu următoarea componență, g/l:

fiertură din fasole	50,00
zaharoză sau zahăr alimentar	20,00
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,00
geloză	20,00
apă stătută	restul.

40 Pentru obținerea fierturii din fasole la 50 g de fasole se toarnă un litru de apă stătută, se fierbe timp de 30 min și se filtrează.

Tulpina se reînsămânțează o dată în decurs de 4...5 luni, iar multiplicarea ei se efectuează la temperatură de 26 ... 28°C.

Pentru inocularea semințelor de lucernă tulpina de bacterii de nodozități *Rhizobium meliloti* CNM RB-03 se cultivă pe mediu nutritiv cu următoarea componență, g/l:

extract de porumb	10,00
melasă	20,00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,50
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,25
$\text{MgSO}_4$	0,20
$\text{CaCO}_3$	1,00

## MD 1254 G2

4

apă stătută

restul.

Exemple de folosire a tulpinii *Rhizobium meliloti* CNM RB-03

5

Exemplul 1

În experiențele de laborator a fost utilizat soiul Tuna. Experiențele s-au efectuat în vase cu sol (cernoziom carbonatat mediu argilos cu umiditatea de 60% din umiditatea totală) în 3 repetiții.

10      Tratarea semințelor de lucernă cu suspensie de tulpină de bacterii de nodozități *Rhizobium meliloti* CNM RB-03 și *Rhizobium meliloti* 425a s-a făcut în cutii Petri. Pentru aceasta în ele se toarnă câte 15 ml de suspensiile cercetate cu titrul de 6 mlrd. celule/ml, se introduc câte 100 semințe de lucernă, se amestecă cu suspensiile și se lasă pe 2...3 ore.

15      După tratare semințele se scot, se usucă în loc umbrat timp de 20...30 min, apoi se încorporează în sol. În fiecare vas pentru dezvoltare au fost lăsate câte 10 plante. Evidența acumulării de masă verde s-a efectuat în faza ramificării plantelor.

Roada de masă verde la lucernă a sporit cu 9,5%, cantitatea de proteină brută de 1,4 ori, numărul de nodozități s-a mărit cu 40,7%, iar activitatea azotofixatoare de 1,9 ori.

20      Rezultatele obținute în experiența de laborator au arătat că tulpina *Rhizobium meliloti* CNM RB-03 în comparație cu tulpina analoagă *Rhizobium meliloti* 425a este mai eficace.

20

Exemplul 2

În condiții de câmp au fost semănat semințe de lucernă tratate cu o suspensie de tulpină de bacterii de nodozități ale tulpinii analoage *Rhizobium meliloti* 425a și cu suspensie de tulpină de bacterii de nodozități *Rhizobium meliloti* CNM RB-03 cultivate în mediu lichid cu extract de porumb și melasă cu titrul de 6 mlrd. celule/ml. Semințele pentru semănat se amestecă cu suspensia de celule, se lasă pe 2...3 ore, se usucă în loc umbrat timp de 20...30 min, pe urmă se încorporează în sol.

25

Experiența a fost efectuată în trei repetiții.

30      Evidența roadei de masă verde la lucernă soiul Tuna s-a făcut în fazele de îmbobocire, începutul înfloririi, în decursul perioadei de vegetație (3...4 coase în perioada de vegetație).

În condiții de câmp tulpina *Rhizobium meliloti* CNM RB-03 a fost mai productivă în comparație cu tulpina *Rhizobium meliloti* 425a. Sub influența tratării semințelor de lucernă cu tulpina propusă în comparație cu tulpina cunoscută roada de masă verde a sporit: în primul an de vegetație cu 10,0 q/ha; în al doilea an cu 40,0 q/ha și în al treilea an cu 128 q/ha, iar cantitatea de proteină brută respectiv cu 1,0; 4,2 și 15,0 q/ha.

35

În decursul a 3 ani de cultivare a lucernei, sub influența tratării ei cu tulpina propusă în comparație cu tulpina cunoscută, masa verde sumar a sporit cu 7,9%, iar cantitatea de proteină brută a crescut cu 14,6% (tab.).

40

Eficacitatea tulpinilor de nodozități asupra productivității la lucernă în condiții de câmp

Varianta	Indicii pe anii						Sumar în 3 ani de cultivare			
	1993		1994		1995		Roaada de masă verde, q/ha	Adaosul față de tulpina analoagă, %	Cantitatea de proteină brută, q/ha	Adaosul față de tulpina analoagă, %
Roaada de masă verde, q/ha	Cantitatea de proteină brută, q/ha	Roaada de masă verde, q/ha	Cantitatea de proteină brută, q/ha	Roaada de masă verde, q/ha	Cantitatea de proteină brută, q/ha					
Martor (fără prelucrare)	553,0	28,1	605,0	36,2	955,0	55,5	2113,0	-	119,8	-
Tratarea semințelor de lucernă cu tulpina <i>Rhizobium meliloti</i> 425a	565,0	28,8	671,0	43,8	1007,0	65,8	2243,0	-	138,4	-
Tratarea semințelor de lucernă cu tulpina <i>Rhizobium meliloti</i> CNM RB-03	575,0	29,8	711,0	48,0	1135,0	80,8	2421,0	7,9	158,6	14,6
DEM <sub>05</sub>	5,8 q/ha 2,1%	8,0 q/ha 4,8%	41,9 q/ha 12,2%							

## MD 1254 G2

5

5

### (57) Revendicare:

10 Tulpină de bacterii de nodozități de lucernă *Rhizobium meliloti*, CNM RB-03, utilizată în calitate de fixator simbiotic de azot.

### (56) Referințe bibliografice:

1. Хотянович А.В., Позднякова А.И., Амстердамская Н.Ю. Труды ВНИИСХМ, 1978, т. 47, с. 111-114
2. Онофреш Л.Ф., Якимова М.Ф., Ковальжиу А.И., Волоскова М.М. Симбиотическая азотфиксация и пути ее повышения. Кишинев, Штиинца, 1992, с. 117-119
3. SU 549454 A

**Șef secție:** CRECETOV Veaceslav

**Examinator:** BAZARENCO Tatiana

**Redactor:** CANȚER Svetlana