



MD 2387 B2 2004.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2387 (13) B2  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 1/20;  
C 05 F 11/08,  
(C 12 N 1/20,  
C 12 R 1:41)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
<p>(21) Nr. depozit: a 2001 0226 (22) Data depozit: 2001.07.17 (41) Data publicării cererii: 2003.04.30, BOPI nr. 4/2003</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2004.02.29, BOPI nr. 2/2004</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ONOFRAȘ Leonid, MD; TODIRAȘ Vasile, MD; BOLOCAN Galina, MD; JIJINA Ala, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

(54) Tulpină de bacterie *Rhizobium phaseoli* ce posedă proprietate azotfixatoare

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la tulpina de bacterie *Rhizobium phaseoli*, care poate fi utilizată în agricultură în calitate de îngrășământ.

Tulpina *Rhizobium phaseoli* este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme a Republicii Moldova (Institutul de Microbiologie al Academiei

5  
de Științe a Republicii Moldova) cu numărul CNM RB-04.

2  
Rezultatul invenției constă în mărirea capacității de fixare a azotului a sistemului radicular al fasolei și în sporirea productivității acesteia.

10  
Revendicări: 1

MD 2387 B2 2004.02.29

## MD 2387 B2 2004.02.29

3

### Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la tulpina de bacterie *Rhizobium phaseoli*, care poate fi utilizată în agricultură în calitate de îngrășământ.

Este cunoscut faptul că pentru leguminoase se utilizează pe larg îngrășăminte microbiene [1,2].

5 Dezavantajul îngrășămintelor cunoscute constă în activitatea de fixare a azotului insuficientă.

Se mai cunoaște că la producerea îngrășământului microbial pentru fasole se folosește tulpina de bacterii *Rhizobium phaseoli* 682 cu capacitate de fixare a azotului atmosferic în simbioză cu planta gazdă [3].

10 Dezavantajul tulpinii *Rhizobium phaseoli* 682 este că activitatea de fixare a azotului atmosferic este insuficientă și nestabilă.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în obținerea unei noi tulpini de bacterii de nodozități pentru fasole.

Problema propusă a fost soluționată grație folosirii noii tulpini de bacterii de nodozități *Rhizobium phaseoli* CNM RB-04.

15 Selectarea și izolarea tulpinii s-a efectuat din nodozități de bacterii mari de culoare roză-roșietică colectate de pe rădăcinile plantelor de fasole cultivate pe cernoziom obișnuit din zona centrală a Republicii Moldova. Bacteriile au fost selectate și izolate conform metodelor deja cunoscute.

Tulpina se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme a Institutului de Microbiologie al Academiei de Științe a Republicii Moldova cu nr. CNM RB-04.

20 Rezultatul invenției constă în aceea că tulpina propusă *Rhizobium phaseoli* CNM RB-04 formează un sistem rizobio-radicular mai activ și mai eficace decât tulpina *Rhizobium phaseoli* 682.

Particularitățile morfoculturale.

25 Celulele bacteriilor au formă de bastonașe cu dimensiunile de 0,5...0,9 x 1,2...3,0 mm. Sunt mobile și se mișcă cu ajutorul a 2...6 cili. Nu formează spori. Bacteriile sunt gram-negative. Cultura crește rapid.

La 2...3 zile cultura însămânțată pe geloză de fasole formează colonii de mărimea 1,8...4,9 mm de culoare albă, mucelaginoase, strălucitoare. Crește abundent pe geloză de fasole și pe mediile cu extract de porumb și melasă. Pe geloză peptonată nu crește.

Particularitățile fiziologobiochimice.

30 Aerobă, gram-negativă, temperatura optimă de creștere a bacteriei este de 26...27°C la pH-ul de 6,8...7,0. Crește bine pe mediile cu săruri de amoniu și amină acidulată. Activ asimilează săruri de azot și amoniu. Nu asimilează celuloză și amidon. Gelatina nu se lichefiază, laptele îl face lunecos sau slab îl peptonizează. Cazeina și agarul nu se hidrolizează.

35 Se păstrează pe geloză de fasole la temperatura de 4...5°C. Reînsămânțarea tulpinii se efectuează o dată în 4 luni.

#### Exemplul 1

În experiențele microvegetative a fost folosită fasolea de soiul Chișinevschii ștambovâi.

Experiențele au fost efectuate în condiții de climă modelată în vase cu cernoziom obișnuit (cu umiditatea de 60...80% din umiditatea totală) în 3 repetiții.

40 Tulpina de bacterii a fost inclusă în mediul nutritiv la vârsta de 2 zile.

Tulpina solicitată a fost cultivată pe un mediu nutritiv cu următoarea componență, g/L:

agar - agar	20,00
zahăr alimentară	20,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	1,00
45 extract de fasole	până la 1L
pH	6,8...7,0.

S-a realizat sterilizarea la 1 atm. timp de 20 min.

50 În fiecare vas pentru creștere și dezvoltare au fost lăsate câte 4 plante. Numărul de nodozități, activitatea azotfixatoare de către sistemul rizobio-radicular și biomasa plantelor s-a determinat în faza de îmbobocire.

În rezultatul cercetării s-a stabilit că masa brută și uscată a plantelor a sporit respectiv cu 28,3 și 22,6%, numărul de nodozități în medie la o plantă s-a mărit de 1,8 ori, iar activitatea azotfixatoare de 1,6 ori.

55 Rezultatele obținute în experiențele microvegetative au arătat că tulpina propusă *Rh. phaseoli* CNM RB-04 este mai activă și mai eficace față de cea cunoscută *Rh. phaseoli* 682.

#### Exemplul 2

Experiența a fost efectuată în condiții de câmp pe teritoriul Bazei științifice experimentale a A.Ș.R.M., solul – cernoziom obișnuit, pH-7,4, în 3 repetiții, folosind fasolea de soiul Chișinevschii ștambovâi.

## MD 2387 B2 2004.02.29

4

Semințele de fasole au fost prelucrate cu suspensii de celule ale tulpinii propuse *Rhizobium phaseoli* CNM RB-04 și ale tulpinii *Rhizobium phaseoli* 682 (cea mai apropiată soluție).

5      Tratarea semințelor s-a efectuat conform instrucțiunii elaborate de laboratorul de fixare a azotului al A.Ș.R.M., care constă în următoarele: semințele se tratează într-un loc umbrat cu suspensii de celule ale bacteriei propuse și ale tulpinii *Rh. phaseoli* 682. Semințele tratate se usucă timp de 20...30 min, apoi se încorporează în sol. Fiecare variantă a experienței a fost efectuată în 3 repetiții.

10     Conform datelor obținute, cea mai înaltă activitate azotfixatoare a sistemului rizobio-radicular la fasole s-a stabilit în fazele de îmbobocire și înflorire a plantelor. Anume în aceste faze s-a determinat activitatea azotfixatoare a sistemului rizobio-radicular și s-a calculat numărul de nodozități formate la plante sub acțiunea tulpinilor *Rhizobium phaseoli* CNM RB-04 și *Rh. phaseoli* 682.

De asemenea, la sfârșitul perioadei de vegetație a plantelor a fost apreciată recolta de boabe. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabel.

15     Acțiunea tulpinilor bacteriilor de nodozități asupra capacității azotfixatoare și productivității fasolelor în condiții de câmp

Varianta	Numărul de nodozități în medie la 1 plantă, buc. $M \pm m$	Activitatea azotfixatoare, mg $N_2$ /plantă/h	Recolta de boabe, q/ha $M \pm m$
1	2	3	4
Tratarea semințelor de fasole cu tulpina <i>Rh. phaseoli</i> 682 (conform celei mai apropiate soluții)	18,0 ± 0,5	14,1	12,4 ± 0,3
Tratarea semințelor de fasole cu tulpina <i>Rh. phaseoli</i> CNM RB-04 (conform invenției)	42,0 ± 0,4	28,0	14,9 ± 0,4

20     Rezultatele obținute demonstrează că tulpina *Rhizobium phaseoli* CNM RB-04 este mai productivă după toți indicii față de cea mai apropiată soluție *Rhizobium phaseoli* 682, și numărul de nodozități s-a mărit de 2,3 ori, activitatea azotfixatoare de 2 ori, iar recolta de boabe cu 20,1%.

### (57) Revendicare:

25     1. Tulpină de bacterie *Rhizobium phaseoli* CNM RB-04 – ce posedă proprietate azotfixatoare.

### (56) Referințe bibliografice:

1. Георгиу В., Негряну В., Думитриу И. Производство, применение и эффективность некоторых биопрепаратов в Румынской Народной Республике. В сб. Бактериальные удобрения. Москва, 1964, с. 66-76
2. Чиканова В.М. Бактериальные удобрения. Минск, 1988, 90 с.
3. Равинская Л.С. Влияние ризобии и минерального азота на урожай фасоли. Тр. VI съезда Всесоюз. микробиол. об-ва. Рига, 1980, т. 5, с. 46

Șef Secție: GUȘAN Ala

Examinator: BAZARENCO Tatiana

Redactor: LOZOVANU Maria