



MD 4226 C1 2013.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4226** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/41* (2006.01)  
*C05F 11/08* (2006.01)

(12)

**BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0093 (22) Data depozit: 2012.10.26</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.05.31, BOPI nr. 5/2013</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ONOFRAȘ Leonid, MD; PRISACARI Svetlana, MD; MOHOVA Tatiana, MD; TODIRAȘ Vasile, MD; SAMOIL Vitalie, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) Tulpină de bacterii *Rhizobium japonicum* – fixatoare de azot pentru soia

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de bacterii *Rhizobium japonicum* și poate fi utilizată în fitotehnie.

Tulpina de bacterii este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme

2  
Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM cu numărul CNMN-RB-06, este fixatoare de azot și poate fi utilizată în calitate de simbiotrof pentru soia.

5  
10 Revendicări: 1

MD 4226 C1 2013.12.31

**(54) Strain of *Rhizobium japonicum* bacteria – nitrogen fixer for soybean**

**(57) Abstract:**

1  
The invention relates to biotechnology, in particular to a strain of *Rhizobium japonicum* bacteria and can be used in plant growing.

The bacterium strain is deposited with the National Collection of Nonpathogenic Micro-

2  
organisms of the Institute of Microbiology and Biotechnology of the ASM under the number CNMN-RB-06, is nitrogen-fixing and can be used as symbiotroph for soybean.

5  
10  
Claims: 1

**(54) Штамм бактерий *Rhizobium japonicum* – азотфиксатор для сои**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к штамму бактерий *Rhizobium japonicum* и может быть использовано в растениеводстве.

Штамм бактерий депонирован в Национальной Коллекции Непатогенных Микро-

2  
организмов Института Микробиологии и Биотехнологии АНМ под номером CNMN-RB-06, является азотфиксирующим и может быть использован в качестве симбиотрофа для сои.

5  
10  
П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în special la o tulpină de bacterii *Rhizobium japonicum* și poate fi utilizată în fitotehnie.

5 Se cunoaște că la producerea îngrășământului biologic pentru soia se utilizează tulpina de bacterii *Rhizobium japonicum* 646a cu activitate de fixare a azotului atmosferic în simbioza cu planta-gazdă [1].

Dezavantajul tulpinii *Rhizobium japonicum* 646a constă în aceea că activitatea de fixare a azotului este insuficientă și nestabilă.

10 Problema pe care o rezolvă invenția propusă este obținerea unei noi tulpini de bacterii de nodozități pentru soia cu un potențial sporit de fixare a azotului atmosferic față de tulpina-etalon.

Problema propusă se soluționează prin aceea că se propune utilizarea tulpinii de bacterii *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 – fixatoare de azot în calitate de simbiotrof pentru soia.

15 Rezultatul tehnic: tulpina propusă *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 formează un sistem rizobio-radicular mai activ și mai efektiv față de tulpina deja cunoscută *Rhizobium japonicum* 646a.

Tulpina se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM cu nr. CNMN-RB-06.

20 *Exemple de realizare a invenției*

Izolarea și selectarea tulpinii s-a făcut din nodozități de bacterii mari de culoare roz de pe rădăcinile plantelor de soia bine dezvoltate din zona de nord a Moldovei, raionul Râșcani, comuna Damascani. Bacteriile au fost izolate și selectate conform metodei aprobate (Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценки их эффективности. Ленинград, 1979, с. 30).

25 Particularitățile morfologice culturale: bacteria este gram-negativă, nu sporulează, celulele culturii pe geloză de mazăre la a 5-a zi de cultivare au mărimea de 2,0...3,0 x 1,0...1,2 μm și formă de bacili. În faza inițială de creștere și dezvoltare monotrihii sunt mobili. Cu timpul bacili își pierd mobilitatea și formează bacterioizi de dimensiuni mari și se prezintă în formă de bastonașe. Creșterea culturii este lentă. Însămânțată pe geloza de mazăre, formează abundent o masă mucilaginoasă de culoare albă, strălucitoare. Coloniile la a 8-9 zi sunt mici de aproximativ 1 mm, ovale, bombate, albe, mucilaginoase.

30 Particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii: aerobe, temperatura optimă de creștere +26...28°C, coloniile apar peste 9...10 zile de cultivare, pH-ul optimal 6,8...7,2. Crește bine pe medii cu azotat de natriu, cu săruri de amoniu. Pe agar peptonat nu crește. Nu lichefiază gelatina, foarte activ asimilează zaharoza, maltoza, lactoza, mai puțin glucoza, foarte puțin xeloza. Nu asimilează celuloza și amidonul.

Se păstrează la temperatura de +4...5°C pe geloza înclinată pe mediu din făină de mazăre. Reînsămânțarea tulpinii se efectuează o dată la 5 luni.

40 *Exemplul 1*

In experimentele vegetative de laborator (în vase cu sol nesteril) în calitate de material semincer s-au folosit boabe de soia (soiul Aura).

45 Experimentele s-au efectuat în condiții de cameră cu climă artificială la temperatura de 20...24°C, umiditatea solului de 60...80% și iluminarea de zi. Durata experimentului – 30 zile.

Prelucrarea semințelor de soia s-a făcut cu tulpina de bacterii cu vârsta de 3 zile. Pentru creștere și dezvoltare în fiecare vas s-au lăsat câte 2 plante, în 3 repetiții.

50 Rezultatele obținute în experimentul de laborator au arătat că tulpina *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 în comparație cu tulpina *Rhizobium japonicum* 646a este mai eficientă (tab. 1).

Tabelul 1

Influența bacteriilor *Rhizobium japonicum* asupra activității azotofixatoare la soia (experiment vegetativ de laborator). Date medii la o plantă

5

Varianta	Masa brută a plantelor, g M±m	Masa uscată a plantelor, g M±m	Fixarea N <sub>2</sub> atmosferic, μg/N <sub>2</sub> /pl./oră
Tratarea semințelor de soia cu tulpina <i>Rhizobium japonicum</i> 646a-etalon	2,75±0,14	0,19±0,01	0,74
Tratarea semințelor de soia cu tulpina <i>Rhizobium japonicum</i> CNMN RB-06 (propusă)	3,29±0,26	0,25±0,02	0,99

Acumularea de masă brută și uscată la soia sub influența tulpinii propuse a sporit cu 19,6 și, respectiv, 31,6%, iar activitatea azotofixatoare – cu 33,8%.

Exemplul 2

10

În scopul aprecierii bacteriilor menționate a fost montat un experiment în condiții de câmp pe teritoriul Bazei Experimentale a Academiei de Științe. Solul – cernoziom obișnuit, pH – 7,4, conținutul de humus – 3,2%. S-au folosit semințe de soia, soiul Aura. Experiența a fost efectuată în 3 repetiții.

15

Semințele de soia au fost tratate cu o suspensie de celule a tulpinii propuse *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 și a tulpinii *Rhizobium japonicum* 646a.

Tehnologia de pregătire a semințelor pentru semănat s-a făcut conform instrucțiunii elaborate de laboratorul de fixare a azotului al AȘM (în prezent – lab. Fitomicrobiologie). Tehnologia constă în următoarele: semințele se tratează cu o suspensie de celule ale bacteriei propuse și ale tulpinii analoge *Rhizobium japonicum* 646a, într-un loc umbrat.

20

După tratare semințele se usucă timp de 20...30 min, apoi se încorporează în sol.

În fazele de imbobocire – înflorire s-a determinat activitatea azotofixatoare a sistemului rizobio-bacterian la plantele de soia sub influența tulpinii propuse și celei analoge (tab. 2).

Tabelul 2

25

Eficacitatea tulpinilor de nodozități asupra capacității azotofixatoare la soia în condiții de câmp

Varianta	Activitatea sistemului rizobio-radicar, μg/N <sub>2</sub> /oră
Martor fără tratare	134,38
Tratarea semințelor de soia cu tulpina <i>Rhizobium japonicum</i> 646a	157,77
Tratarea semințelor de soia cu tulpina <i>Rhizobium japonicum</i> CNMN-RB-06	172,53

30

Rezultatele obținute au demonstrat că tulpina propusă *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 în condiții de câmp este mai activă și mai productivă față de cea analogă *Rhizobium japonicum* 646a. În urma tratării semințelor, conform tehnologiei propuse, cu suspensia de celule ale tulpinii *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06, activitatea azotofixatoare s-a majorat cu 9,4% față de tulpina analogă *Rhizobium japonicum* 646a.

35

Acest indice s-a majorat considerabil față de martorul netratat (tab. 2).

*Exemplul 3*

În scopul verificării prin comparație a rezultatelor obținute în experimentele efectuate anterior, a fost montată o experiență pe câmpul de testări a culturilor agricole a Ministerului Agriculturii și Industriei Alimentare din s. Băcioi, mun. Chișinău.

5 Condițiile experimentului au fost următoarele:

- solul – cernoziom carbonat, pH – 7,0...7,2.

- planta-gazdă: soia, soiul Aura,

- bacteria testată – tulpina *Rhizobium japonicum* CNMN RB-06,

- tulpina-etalon - *Rhizobium japonicum* 646a,

10 - utilizarea bacteriilor s-a făcut prin prelucrarea semințelor de soia cu tulpinile respective înainte de semănat,

- martorul – fără tratarea semințelor.

Datele experimentale sunt prezentate în tabelul 3.

*Tabelul 3*

15

Influența bacteriilor de nodozități *Rhizobium japonicum* asupra capacității azoto-fixatoare și productivității la soia în condiții de câmp (producere) – s. Băcioi, mun. Chișinău

Varianta	Activitatea azotofixatoare, $\mu\text{g}/\text{N}_2/\text{pl.}/\text{oră}$	Recolta de boabe, $\text{kg}/\text{parcelă } M\pm m$
Martor (fără tratare)	6,2	6,30 $\pm$ 0,42
Tratarea semințelor de soia cu tulpina <i>Rhizobium japonicum</i> 646a	69,3	8,10 $\pm$ 0,14
Tratarea semințelor de soia cu tulpina <i>Rhizobium japonicum</i> CNMN-RB-06	110,4	8,65 $\pm$ 0,21

20

În condiții de câmp tulpina *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 a fost mai productivă în comparație cu tulpina *Rhizobium japonicum* 646a. Sub influența tratării semințelor de soia cu tulpina propusă în comparație cu tulpina analoagă activitatea azotofixatoare s-a majorat cu 59,3%, iar recolta de boabe – cu 6,8%.

25

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. Парахин Н.В., Осин А.А., Осина В.С. Урожайность и симбиотическая активность сои при моно-двойной инокуляции ризоторфином и гломусом. Аграрная наука, 2008, №5, с. 16

**(57) Revendicări:**

Tulpină de bacterii *Rhizobium japonicum* CNMN-RB-06 fixatoare de azot în calitate de simbiotrof pentru soia.

**Șef Secție:** IUSTIN Viorel

**Examinator:** LUPAȘCU Lucian

**Redactor:** LOZOVANU Maria