

**POTENTIAL PENTRU
BIOREMEDIEREA SOLURILOR
CALCAROASE CU BACTERII
RIZOSFERICE SI ACIZI HUMICI**

*Svetlana G. Bratkova, Universitatea de
minerit și geologie “st. Ivan Rilski , Sofia,
Bulgaria*

*Katerina T. Nikolova, Universitatea de
minerit și geologie “st. Ivan Rilski , Sofia,
Bulgaria*

*Konstantin I. Chakalov, Romb ltd.,
Sofia, Bulgaria*

**Autor , e-
mail:s_bratkova@yahoo.com**

REZUMAT: Solurile calcaroase, care sunt tipice pentru zonele calde și uscate conțin minerale, cum ar fi calcitul și dolomita, care cresc pH-ul solului și înrăutățesc condițiile de nutriție a plantelor cu microelemente și parțial cu fosfor și azot. Potențialul de bioremediere unui asemenea sol, cu bacterii rizosferice și acizi humici a fost studiat la testul vegetației în vas . Planta testată a fost *Medicago sativa* (Lucernă). Tulpinile speciei *B. subtilis* și *B. amiloliquefaciens* au fost izolate de rizosfere ale *Cichorium intybus* (Cicoare comună), populând zona cu sol carbonat. Acizii humici utilizați au fost extrasi din leonardite. Nu există un efect semnificativ al culturilor microbiene asupra proprietățile fizico-chimice ale solului carbonat. Testul arată că microorganismele în monoterapie sau în asociere cu acid humic scad calciul activ cu 5 până la 20%. Compoziția de sol carbonic organic, după tratamentul cu acizi humici, a fost schimbată cu tipul humate. Biomasa lucernei, după tratarea solurilor cu cultura microbială în monoterapie sau în asociere cu acid humic, a crescut în intervalul de 5 până la 10 ori.

CUVINTE CHEIE: soluri calcaroase, bioremediere, microorganisme, acid humic, rizosferă

1. INTRODUCERE

Solurile carbonatice cu textură și compoziția diferită sunt larg expuse în planul Tracian (Dimitrov et al. 2009). Solurile carbonatice sunt produse ale unui facies specific depozițional, care este comun pentru zonele calde și uscate, de obicei, cu precipitații sub 1000 mm. Principalii constituenți ai calcretului sunt mineralele, calcitul și dolomita, dar și o varietate de alte minerale, cum ar fi gips sau calcedonie pot să apară în cantități mici.

pH-ul ridicat și nivelurile CaCO₃ din

**POTENTIAL FOR
BIOREMEDIATION OF
CALCAREOUS SOILS BY
RHIZOSPHERIC BACTERIA AND
HUMIC ACIDS**

*Svetlana G. Bratkova, University of
mining and geology “st. Ivan Rilski ,
Sofia, Bulgaria*

*Katerina T. Nikolova, University of
mining and geology “st. Ivan Rilski ,
Sofia, Bulgaria*

*Konstantin I. Chakalov, Romb ltd., Sofia,
Bulgaria*

**Corresponding author, e-
mail:s_bratkova@yahoo.com**

ABSTRACT: Calcareous soils, which are typical for warm and dry areas contain minerals such as calcite and dolomite, which increase pH of the soil and worsen the conditions of plants nutrition with microelements and partly with phosphorus and nitrogen. The potential for bioremediation of such soil by rhizospheric bacteria and humic acids were studied in pot vegetation test. Test plant was *Medicago sativa* (Alfalfa). The strains of species *B. subtilis* and *B. amiloliquefaciens* were isolated from rhizospheres of *Cichorium intybus* (Common chicory), inhabiting the area with carbonate soil. The used humic acids were extracted from leonardite. There isn't significant effect of microbial cultures on physical-chemical properties of the carbonate soil. The test shows that microorganisms alone or in combination with humic acid decrease the active calcium with 5 to 20%. The composition of the soil organic carbon, after treatment with humic acids, was changed to humate type. The biomass of alfalfa, after treatment of soils with microbial culture alone or in combination with humic acid, was increased in the range of 5 to 10 times.

KEY WORDS: Calcareous soils, bioremediation, microorganisms, humic acid, rhizosphere

1. INTRODUCTION

Carbonate soils of different texture and composition are widely exposed in the Thracian plane (Dimitrov et al. 2009). The carbonate soils are product of a specific depositional facies, which is common for warm and dry areas, usually with rainfall under 1000 mm. The main constituents of the calcrete are the minerals calcite and dolomite, although a variety of other minerals such as gypsum or chalcedony may occur in

solurile calcaroase sunt în principal responsabili de disponibilitatea scăzută a substanțelor nutritive. Prezența CaCO_3 în soluri, în mod direct sau indirect afectează disponibilitatea N, P, Mg, K și (Brady și Weil, 2002). PH-ul alcalin al solului calcaros a redus, de asemenea, semnificativ solubilitatea microelementelor Fe, Zn, Mn și Cu, care sunt necesare pentru creșterea plantelor.

Microorganismelor din sol joacă un rol important în ciclurile biogeochimice. Rizosfera este zona de sol încadrând rădăcina, care este afectată de aceasta. Există mai multe rapoarte privind promovarea creșterii plantelor și îmbunătățirea randamentului prin promovarea creșterii de plante rizobacteria (PGPR) (Lugtenberg et al. 2009). PGPR arată mecanisme directe și indirecte de stimulare a creșterii plantelor, cum ar fi: creșterea fixațiilor și administrarea azotului atmosferic; transformarea solidului pentru a dizolva compușii fosforici în ceva ușor de asimilat; producția de siderofores, chelatare fierului într-o formă biologic absorbabilă; sinteza microbiană a substanțelor fiziologice active (fitohormoni - auxine, cytokinins, gibberellins, vitamine, aminoacizi, și altele); sinteza exopolizaharidelor; biocontrolul plantelor infectate patogenice, prin sinteza substanțelor cu acțiune de antibiotice și ciuperci-toxice; schimbarea permeabilității membranei celulelor radacinoase, și o creștere în capacitățile de absorbție ale rădăcinilor plantelor.

Celelalte componente majore ale solului sunt substanțe humice (acizi humici și fulvici). Substanțele humice din sol pot avea atât efecte directe cât și indirecte asupra creșterii plantelor. Efectele indirecte implică o îmbunătățire a proprietăților solului, cum ar fi agregarea, aerarea, permeabilitatea, capacitatea de reținere a apei, transportul ionilor prin tamponare și disponibilitatea pH-ului. Materialele humice au o abundență de grupe de carboxil și grupe slabe de acizi fenolici, care contribuie la complexarea lor și schimbarea proprietăților ionice. Materialele humice sunt capabile să facă complexi diferiți cationi și să fie folosite ca o chiuveta pentru cationii polivalenți din sol.

Obiectivele acestui studiu au fost de a investiga niste parametri de sol și structura comunităților microbiene în profunzime a solurilor agricole, afectate de formarea de

minor amounts.

High pH and CaCO_3 levels in calcareous soils are predominantly responsible for low availability of plant nutrients. The presence of CaCO_3 in soils directly or indirectly affects the availability of N, P, Mg, and K (Brady and Weil, 2002). The alkaline pH of calcareous soil also greatly reduced the solubility of microelements Fe, Zn, Mn and Cu, which are necessary for plant growth.

Soil microorganisms play an important role in biogeochemical cycles. The rhizosphere is the zone of soil surrounding the root which is affected by it. There are many reports on plant growth promotion and yield enhancement by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Lugtenberg et al. 2009). PGPR show direct and indirect mechanisms of plant growth stimulation such as: increasing of the fixation and administration of the atmospheric nitrogen; transformation of hard to dissolve phosphoric compounds into easily assimilated one; production of siderophores, chelation of iron into a biologically absorbable form; microbial synthesis of physiologically active substances (phytohormones - auxins, cytokinins, gibberellins, vitamins, aminoacids, and others); synthesis of exopolysaccharides; biocontrol of infected pathogenic plants, through synthesis of substances with antibiotic and fungi-toxic action; change of membrane permeability of root cells, and an increase in the absorption capabilities of the plant roots.

The other major components of soil are humic substances (humic and fulvic acids). The humic substances in the soil might have both direct and indirect effects on plant growth. Indirect effects involve improvement of soil properties such as aggregation, aeration, permeability, water holding capacity, ions transport and availability through pH buffering. Humic materials have an abundance of carboxyl groups and weakly acidic phenolic groups, which contribute to their complexation and ion-exchange properties. Humic materials are able to complex various cations and serve as a sink for polyvalent cations in the soil.

The objectives of this study were to investigate some soil parameters and the structure of microbial communities in the depth of agricultural soil, affected by formation of calcrete; to

calcrete, pentru a determina efectul creșterii plantelor promovând și bacteriile și acizii humici (separat și mixt) și câțiva parametri agrochimici și creșterea de *Medicago sativa* (Lucerna) în sol calcaros.

determine the effect of plant growth-promoting bacteria and humic acids (separately and mixed) on some agrochemical parameters and the growth of *Medicago sativa* (Alfalfa) in calcareous soil.

2. MATERIALE ȘI METODE

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Prelevarea de probe

2.1. Sampling

Terenul de eșantionare pentru acest studiu este situat la aproximativ 1 km nord-vest de satul Scalitsa (WGS84, Lat / Lon: 42.275224 ° N, 26.242694 ° E). Punctul de prelevare este situat la aproximativ 170 m altitudine deasupra nivelului mării. Topografia este dominată de dealuri domoale. Horizontul petrocalcic apare la 25 - 35 cm sub suprafața și grosimea sa este între 1,0 și 3,0 m. Acest strat conține diferite cantități de calcit și dolomită. Probe de sol au fost colectate cu un echipament de foraj de la adâncimi 0-20, 20-40 și 40-60 cm.

The sampling site for this study is located about 1 km northwest of the village Scalitsa (WGS84, Lat/Lon: 42.275224° N, 26.242694° E). The sampling point is located at about 170 m height above sea level. The topography is dominated by gentle hills. The petrocalcic horizon occurs 25 - 35 cm under the surface and its thickness is between 1.0 and 3.0 m. This layer contains various amounts of calcite and dolomite. Soil samples were collected with a bore-hole equipment at depths 0-20, 20-40 and 40-60 cm.

2.2. Aplicarea bacteriei rizosferice și a acizilor humici

2.2. Application of rhizospheric bacteria and humic acids

Solul utilizat în acest studiu a fost colectat de la 0-40 cm adâncime în pamânt în timpul verii. Probele din solul uscat la aer au fost trecute prin sita de 4 mm.

The soil used in this study was collected from 0-40 cm depth of the field in summer. Air-dried soil samples were passed through 4 mm-sieve.

Tabel 1. Schema aplicațiilor
Table 1. The scheme of applications

Variant	Quantity per pot
1 control	-
2 CIR1 - CIR4	100 ml (10 ml/l)
3 Humic acids	100 ml (50 g HA/l)
4 CIR1 - CIR4 + Humic acids	100 ml (10 ml/l + 50g HA/l)

Solul a fost omogenizat și pus în vase de plastic cu volum de 10 dm³. Îngrășământul bazal a fost aplicat în vase înainte de plantare. Fiecare vas a fost tratat cu soluție de 100 ml, constând în macroelemente de azot, fosfor și potasiu în concentrație KH₂PO₄ - 1 g / l și NH₄NO₃ - 2 g / l.

The soil was homogenized and put into plastic pots with volume 10 dm³. Basal fertilizer was applied to the pots before planting. Each pot was treated with 100 ml solution, consisting macroelements nitrogen, phosphorus and potassium in concentration KH₂PO₄ - 1 g/l and NH₄NO₃ - 2 g/l.

Bacteriile rizosferice și acizii humici sunt aplicați în conformitate cu schema, reprezentată în Tabelul 1. Fiecare cerere este formată din trei subeșantioane.

The rhizospheric bacteria and humic acids are applied according the scheme, represented in Table 1. Each application consists of three replications.

Tulpinile CI R1, R2 CI, R3 și R4 CI CI au fost izolate de rizosferele a două plante *Cichorium intybus* (Cicoare comună). Secvențele genetice nucleotide 16S rRNA au fost utilizate pentru identificarea a patru tulpini (Bratkova et al. 2012). Tulpinile CI R3 R1 și CI au fost găsite ca facand parte din speciile *Bacillus subtilis* și tulpinile CI R2 și R4 CI din speciile *Bacillus amyloliquefaciens*. În scopul studiului, tulpinile CI R1, R2 CI, R3 și R4 CI CI au fost crescute într-un mediu microbial constand in fiertura nutritiva, glucoză și extract de drojdie. Ele au fost incubate timp de 24 h pe un shaker rotativ la 200 rpm la 30°C. Culturile microbiene obținute au fost amestecate și diluate de o sută de ori. Varianta 2 a fost tratată o dată cu 100 ml de soluție diluată microbială.

Acizii humici au fost derivați din leonardite. Humatele de potasiu obținute au fost aplicate pentru varianta 3, soluție de 100 ml la doza de 50 g / l acizi humici. Ultima variantă a experimentului a fost tratată cu 100 ml de soluție conținând ambele specii microbiene și acizi humici, la aceleași concentrații. 0,5 g de lucernă (*Medicago sativa*) au fost semănate în fiecare vas la o adâncime de 5 mm în sol. După o perioadă de vegetație de două luni, vâstarul a fost atent tăiat.

2.3. Metode de studiu Analiză chimică. Determinarea pH-ului s-a efectuat conform Standardului Internațional ISO 10390 БДC. Concentrațiile totale de carbon au fost determinate prin combustie uscată prin intermediul unui analizor elementar (Standart Internațional ISO10694). Carbonul prezentat în sol a fost oxidat la dioxid de carbon (CO₂), prin încălzirea solului la cel puțin 900 ° C într-un flux de oxigen care conținea gaz ,fără dioxid de carbon. Cantitatea de dioxid de carbon eliberata fost apoi măsurată prin metoda de detectare prin infraroșu. Conținutul de carbon organic din sol a fost determinat conform Standardului Internațional ISO 14235 БДC prin oxidare într-un amestec de soluție dicromata și acid sulfuric, la o temperatură de 135 ° C.

Totalul de azot (N-amoniu, nitrat-N, N-nitriți și organice N), conținut în sol a fost determinat de digestia Kjeldahl, potrivit Standart Internațional ISO 11261 БДC L. Totalul de fosfor a fost extras

The strains CI R1, CI R2, CI R3 and CI R4 were isolated from rhizospheres of two plants *Cichorium intybus* (Common chicory). 16S rRNA gene nucleotide sequences were used for identification of four strains (Bratkova et al. 2012). The strains CI R1 and CI R3 were found to belong to the species *Bacillus subtilis* and the strains CI R2 and CI R4 to the species *Bacillus amyloliquefaciens*. For the purpose of the study the strains CI R1, CI R2, CI R3 and CI R4 were growth on microbial medium consisting nutrient broth, glucose and yeast extract. They were incubated for 24 h on a rotary shaker at 200 rpm at 30°C. The obtained microbial cultures were mixed and diluted a hundredfold. The variant 2 was treated once with 100 ml diluted microbial solution.

The humic acids were derived from leonardite. The obtained potassium humate were applied to variant 3 as 100 ml solution at the dose 50 g/l humic acids. The last variant of the experiment was treated with 100 ml solution containing both microbial species and humic acids at the same concentrations.

0.5 g alfalfa (*Medicago sativa*) were sown per pot at a depth of 5 mm into the soil. After a two month vegetation period, the shoot biomass was carefully cut off.

2.3. Study methods

Chemical analysis. The pH determination was performed according to the International Standart БДC ISO 10390. Total carbon concentrations were determined by dry combustion via an elemental analyzer (The International Standart ISO10694). The carbon presented in the soil was oxidized to carbon dioxide (CO₂) by heating the soil to at least 900°C in a flow of oxygen-containing gas that was free from carbon dioxide. The amount of released carbon dioxide was then measured by infrared detection method. The organic carbon content in soil was determined due to the International Standart БДC ISO 14235 by oxidation in a mixture of dichromate solution and sulfuric acid at a temperature of 135°C.

Total nitrogen (ammonium-N, nitrate-N, nitrite-N and organic N), content in soil was determined by Kjeldahl digestion, according the International Standart БДC ISO 11261 l. Total phosphorus was extracted using БДC EN 13346 and determined

cu ajutorul БДC RO 13346 și determinat prin analiza spectrofotometrică. Fracția solubilă în apă de calciu și magneziu a fost stabilită cu БДC ISO 11048. Fosforul și potasiul disponibili au fost determinați prin metoda Egner-Riehm. Cationii schimbabili de sodiu, potasiu, calciu și magneziu (Na, K, Ca și Mg) au fost extrasi cu acetat de amoniu la pH 7,0 (Scholenberger și Simon 1945). Na și K au fost determinați de către fotometrul Flame iar Ca și Mg de către titrarea complexometrică EDTA. Carbonatul de calciu activ a fost determinat cu 0,01 M NM4-oxalat folosind un sol 1:25: raportul de soluție și agitare 2 h la 250 rpm pe un shaker cu piston (Drouineau 1942).

Analiză microbiologică. Suma celulelor viabile ale diferitelor grupuri de microorganisme a fost determinată de placa standard sau metode de totalizare mass-media.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Proprietăți generale geochimice ale substratului solului

pH-ul solului (Tabelul 2), în terenul Scalitsa este în intervalul 8.41 - 8.85, valorile cele mai mari ale pH-ului s-au găsit în profunzime, care este mai aproape de calcretele hardpan. Valori mari ale carbonului total (72.6 - 86.2 g kg⁻¹) au fost descoperite la o adâncime de la 0 la 60 cm. O parte semnificativă a acestuia este anorganică și este concentrată în noduli calcrete, care sunt comuni în solurile dezvoltate în partea de sus a calcretelor. Cantitatea de carbon organic este mai mare - 20 g kg⁻¹ la stratul de sus, și se reduce pe măsură ce crește adâncimea solului la 3,3 g kg⁻¹. Azotul total în stratul de suprafață (0 până la 20 cm) este de aproximativ 1,8 g kg⁻¹. În profunzime, conținutul de azot scade la fel ca în stratul de 40 - 60 cm de la suprafață, este abia 0.19 g kg⁻¹. Fosforul este distribuit în mod similar profilului solului. Cel mai mare conținut de fosfor - 1,9 g kg⁻¹ a fost găsit în suprafața stratului de sus și cea mai mică (0,19 g kg⁻¹) - în stratul de 40 cm la 60.

3.2. Analizele culturale ale structurii comunitare în sol

Cel mai mare număr de heterotrofe aerobe și anaerobe (mai mult de 10⁶ celule / g) a fost găsit

by spectrophotometrical analysis. Water-soluble fraction of calcium and magnesium was established with БДC ISO 11048. Available phosphorous and potassium were determined by the Egner-Riehm method. Exchangeable cations sodium, potassium, calcium and magnesium (Na, K, Ca and Mg) were extracted with ammonium acetate at pH 7.0 (Scholenberger and Simon 1945). Na and K were determined by Flame photometer and Ca and Mg by EDTA complexometric titration. Active calcium carbonate was determined with 0.01 M NM4-oxalate using a 1:25 soil:solution ratio and shaking 2 h at 250 rpm on a reciprocating shaker (Drouineau 1942).

Microbiological analysis. Count of viable cells of different groups of microorganisms was determined by the standard plate- or liquid media count methods.

3. Results and Discussion

3.1. General geochemical properties of the soil substrate

The pH of the soil (Table 2) in the Scalitsa site is in the range 8.41 to 8.85, as the higher pH values were found in depth, that is closer to the calcrete hardpan. High values of total carbon (72.6 – 86.2 g kg⁻¹) were found at a depth of 0 to 60 cm. Significant part of it is inorganic and are concentrated in calcrete nodules, which are common in the soils developed on top of calcrete. The amount of organic carbon is higher - 20 g kg⁻¹ at the top layer, and it is reduced as soil depth increases to 3.3 g kg⁻¹. Total nitrogen in the surface layer (0 to 20 cm) is about 1.8 g kg⁻¹. In depth, the nitrogen content decreases as in the 40 to 60 cm layer from the surface it is barely 0.19 g kg⁻¹. The phosphorus is similarly distributed in the soil profile. Highest phosphorus content – 1.9 g kg⁻¹ was found in the top surface layer and the lowest (0.19 g kg⁻¹) - in the 40 to 60 cm layer.

3.2. Cultural community structure analyses in soil

Highest number of aerobic and anaerobic heterotrophs (more than 10⁶ cells/g) was found at depth of 0-40 cm, an area with higher humidity and highest rates of organic carbon presence. In the rest of the soil profile the number of

la adâncimea de 0-40 cm, o zonă cu umiditate ridicată și cele mai mari șanse de prezență a carbonului organic. În restul profilului solului numărul de bacterii heterotrofe scade la $2,6 \cdot 10^2$ celule / g. Cel mai mare număr al tuturor polimerilor organici -- bacterii degradante au avut bacterii amilolitice ($5,8 \cdot 10^6 - 2,5 \cdot 10^7$ celule / g), cu un maxim în stratul 0-40 cm. Numărul de actinomicete a fost în intervalul $4,8 \cdot 10^4 - 9,6 \cdot 10^4$ celule / g în stratul organic al profilului de sol. Cu privire la bacteriile implicate în procesul de transformare a azotului în mostre de sol 0 - 40 cm, a fost calculată o cantitate mare de azot -- bacterii de fixare (mai mult de 10^6 celule / g). Numărul de bacterii amonifiante a fost în intervalul $10^2 - 10^4$ celule / g. Cea mai mare parte a bacteriilor denitrificatoare ($7,2 \cdot 10^4$ celule / g) a fost găsită în zona 0-20 cm, la fel ca în restul profilului de sol, numărul lor scade. Bacteriile nitrificatoare s-au caracterizat printr-un număr mic (10^2 celule / g), și au fost găsite doar la adâncimea 0 - 20 cm. Numărul de bacteriilor cu sulfat redus a fost mai mare, de asemenea, de la suprafața la adâncime de 40 cm. Numărul lor în calcrete masive aride a scăzut la 101 celule / g.

heterotrophic bacteria drop to $2,6 \cdot 10^2$ cells/g. The highest number of all organic polymers-degrading bacteria had the amylolytic bacteria ($5,8 \cdot 10^6 - 2,5 \cdot 10^7$ cells/g), with a maximum in the layer 0-40 cm. The number of actinomycetes was in the range $4,8 \cdot 10^4 - 9,6 \cdot 10^4$ cells/g in organic layer of soil profile. About the bacteria involved in the transformation of nitrogen in soil samples from 0 - 40 cm was counted a large amount of nitrogen-fixing bacteria (more than 10^6 cells/g). The number of amonifying bacteria was in the range $10^2 - 10^4$ cells/g. The most part of denitrifying bacteria ($7,2 \cdot 10^4$ cells/g) was found in the area 0-20 cm, as in the rest of the soil profile, their number decrease. The nitrifying bacteria were characterized with a low number (10^2 cells/g) and they were found only at the depth 0 - 20 cm. The number of sulfate-reducing bacteria was higher also from the surface to 40 cm depth. Their number in barren massive calcrete was fall to 10^1 cells/g.

Tabel 2. Parametrii de bază ai solului din site-ul Scalitsa descoperit în timpul eșantionării de primăvară

Table 2. Basic soil parameters from the Scalitsa site found during the spring sampling

Parameter	Sampling depth, cm		
	0-20	20-40	40-60
pH(H ₂ O)	8.41	8.69	8.85
Specific conductivity, mS/cm	0.137	0.113	0.102
Total carbon content, g/kg	72.6	71.3	86.2
Organic carbon content, g/kg	20.0	13.0	3.3
Total nitrogen content, g/kg	1.8	1.5	<0.2
Total phosphorus content, g/kg	1.9	1.3	0.19
Water-soluble hydrogen-carbonates, meq /100g	0.70	0.56	0.42
Water-soluble calcium, meq/ 100g	0.84	0.55	0.58

3.3. Efectele aplicării bacteriilor rizosferice și acizilor humici asupra unor parametri de sol și de creștere a plantelor.

Datele despre efectele aplicării microorganismelor și a acizilor humici privind capacitatea de schimb a cationilor și cationii interschimbabili sunt prezentați în tabelul 3. Conform rezultatelor analizei, tratamentul cu Humate de potasiu crește K + schimbabil, în

3.3. Effects of application of rhizospheric bacteria and humic acids on some soil parameters and plant growth.

The data about the effects of application of microorganisms and humic acids on cation exchange capacity and exchangeable cations are given in Table 3. According to the analysis results, the treatment with potassium humate increase exchangeable K⁺ in the range of 3 to 4

intervalul de 3 până la 4 ori, dar acest efect nu modifica capacitatea de schimb cationica a solului. S-a constatat, că majorarea K + schimbili este legata de scăderea Ca²⁺ + schimbabil.

Electroconductivitatea specifică a extractului saturat din solurile calcaroase caracterizeaza acest substrat ca fiind sarac în săruri. Creștere nesemnificativă a CE a fost găsită în toate solurile tratate.

times, but this effect doesn't change cation exchange capacity of the soil. It was found, that the increase of exchangeable K⁺ is related with decrease of exchangeable Ca²⁺.

The specific electroconductivity of calcareous soils saturation extract characterizes this substrate as poor in salts. The insignificant increase of EC was found in all treated soils.

Tabel 3. Capacitatea de schimb a cationilor si cationi interschimbabili in sol calcretious, meq/100g

Table 3. Cation exchange capacity and exchangeable cations in calcretious soil, meq/100g

	Treatment	CEC	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Σ cations
	Control before vegetation	10,00	0,36	0,22	34,70	2,10	37,38
1	control	9,80	0,32	0,27	34,70	2,10	37,39
2	CI R1 - CI R4	9,93	0,29	0,27	34,50	2,30	37,36
3	Humic acids	10,08	0,99	0,27	33,90	2,40	37,56
4	CI R1 - CI R4 + Humic acids	9,95	1,34	0,27	34,10	1,80	37,51

Solurile afectate de formarea de calcrete au un conținut scăzut de K₂O disponibil și P₂O₅ disponibil. Tratatamentul cu Humate de potasiu ridică nivelul de K disponibil la o valoare benefica pentru creșterea plantelor. Efectul important al microorganismelor aplicate și acizilor humici este scăderea concentrației de CaCO₃ activ. Măsurarea carbonatului de calciu echivalent (CCE) în soluri calcaroase este comună și este utila pentru evaluarea proceselor de sol. Reactivitatea carbonatului de calciu activ este legata de mai multe ori decât CCE de procesele sau proprietățile solului. În solurile alcaline fosforul este fixat de CA, care cauzeaza o eficiența scăzută. Acest efect al disponibilității reduce P din solul alcalin este determinat de reacția P cu calciu, cu cea mai mica solubilitate a acestor minerale de fosfat de calciu la un pH de aproximativ 8. Datele din tabelul 4 arată că bacteriile rizosferice în monoterapie sau în asociere cu acidul humic scad calciul activ cu 5 până la 20%.

Datele biometrice (tabelul 5) demonstrează că speciile *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, și acizii humici au un

The soils affected by formation of calcrete have low content of available P₂O₅ and available K₂O. The treatment with potassium humate raises the level of available K to value beneficial for plants growth. The important effect of applied microorganisms and humic acids is decrease of concentration of active CaCO₃. The measurement of calcium carbonate equivalent (CCE) in calcareous soils is common and is useful for the evaluation of soil processes. Active calcium carbonate reactivity is related more highly at times than CCE to soil processes or properties. In alkaline soils phosphorus is fixed by Ca, which causes its low efficiency. This effect of reduced P availability in alkaline soil is driven by the reaction of P with calcium, with the lowest solubility of these calcium phosphate minerals at about pH 8. The data in table 4 shows that rhizospheric bacteria alone or in combination with humic acid decrease the active calcium with 5 to 20 %.

The biometric data (Table 5) demonstrates that the species *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, and humic acids have strong positive effect on plants growth.

puternic efect pozitiv asupra creșterii plantelor.

Biomasa vâstarului format din lucerna în control a fost mica, din cauza solubilității scăzute a nutrienților, precum și deficiențele de macro-și microelemente. Rezultatele din acest studiu arată ca tulpinile *B. subtilis* CIR1 și CIR3, *B. amyloliquefaciens* CIR2 și CIR4, izolate de rizosferele cicoarei aparțin promovării dezvoltării rizobacteriilor. Oliveira et al. (2009) au raportat că printre tulpinile bacteriene, sp *Bacillus*. și *Burkholderia* sp. au fost cele mai eficiente tulpini de solubilizare P din soluție de cultura P-Ca. Cele mai multe dintre soluri conțin rezervele substanțiale ale totalului P; mare parte din el rămâne relativ inert și doar mai puțin de 10% din solul P intră în ciclul plantă-animal. Bacteriile de fosfat solubile (PSB) joacă un rol important în creșterea disponibilității fosforului plantelor prin reducerea pH-ului solului și prin producția microbiană de acizi organici și mineralizarea P-ului organic prin fosfataze acide (Awasthi et al. 2011). Tulpinile izolate *B. subtilis* CI R1 și R3 CI produc, de asemenea, enzimele alcaline și fosfatazele acide. Tulpinile *B. amyloliquefaciens* CIR2 și CIR4 produc numai fosfataza alcalina (datele nu sunt publicate).

The formed shoot biomass of alfalfa in control was little because of low solubility of nutrients and the deficiencies of macro- and microelements. The results from this study show that the strains *B. subtilis* CIR1 and CIR3, *B. amyloliquefaciens* CIR2 and CIR4, isolated from rhizosphere of chicorium belong to plant growth promoting rhizobacteria. Oliveira et al. (2009) reported that among the bacterial isolates, *Bacillus* sp. and *Burkholderia* sp. were the most efficient P-solubilizing strains from P-Ca source culture solution. Most of the soils contain the substantial reserves of total P; large part of it relatively remains inert and only less than 10% of soil P enters the plant-animal cycle. Phosphate solubilising bacteria (PSB) play an important role in enhancing phosphorous availability to plants by reducing soil pH and by microbial production of organic acids and mineralization of organic P by acid phosphatases (Awasthi et al. 2011). The isolated strains *B. subtilis* CI R1 and CI R3 also produce the enzymes alkaline and acid phosphatases. The strains *B. amyloliquefaciens* CIR2 and CIR4 produce only alkaline phosphatase (data are not published).

Tabel 4. Efectul bacteriilor rizosferice și al acizilor humici asupra creșterii lucernei

Table 4. Effect of rhizospheric bacteria and humic acids on growth of alfalfa

	control	CIR1-CIR4	HA	CIR1 - CIR4 + HA
Fresh shoot biomass, g	0,39	2,19	2,97	3,39
% to control	100	563	762	1000
Dry shoot biomass, g	0,09	0,42	0,49	0,65
% to control	100	465	548	730

Table 5. Efectele aplicării microorganismelor și acizilor humici asupra unor parametri agrochimici

Table 5. The effects of application of microorganisms and humic acids on some agrochemical parameters

VARIANT	pH	EC mS/cm	Active CaCO ₃ , %	Total N, g/kg	Total P, g/kg	Org. C, g/kg	Available P ₂ O ₅ , %	Available K ₂ O, %
Control before veg.	8,48	0,129	9,14	0,69	0,616	9,2	5,38	12,59
control	8,26	0,149	11,01	0,79	0,672	9,6	7,35	17,23
CIR1 - CIR4	8,11	0,176	10,46	0,84	0,821	9,6	6,60	14,58
Humic acid	8,19	0,170	10,09	0,78	0,769	9,6	4,60	46,38
CI R1 - CI R4 +	8,22	0,171	8,84	0,82	0,789	10,3	5,95	54,33

HA								
----	--	--	--	--	--	--	--	--

Humate-ul de potasiu aplicat sporește, de asemenea creșterea lucernei. Acizii humici influențează creșterea plantelor, atât în mod direct și cat si indirect. În mod indirect, ei îmbunătățesc condițiile fizice, chimice și biologice ale solului (Katkat A. et al. 2009). Acizii humici izolează calciul solubil pentru a proteja fosfații. Grupele amino funcționale cu privire la acizii humici pot adsorbi anioni de fosfat, de asemenea. Acidul humic îmbunătățește fertilitatea solului și productivitatea culturilor pe soluri calcaroase (Rajpar et al. 2011).

Biomasa lucernei, după tratarea solurilor cu cultura microbiană, în combinație cu acizii humici, a fost crescut de 10 ori. Acest efect este o combinație de schimbări de chimie a solului, ca urmare a acizilor humici aplicați, precum și diferitelor metaboliți microbiene, produse de bacterii rizosferice izolate.

4. CONCLUZII

Prezența de calcrete este motivul de bază pentru alcalinizarea solului, schimbările de structură și concentrațiile scăzute ale P, Mg, și K disponibili. Acest efect negativ, împreună cu conținutul scăzut de carbon organic și fracțiunile de azot au un impact nefavorabil asupra comunității microbiene a solului, care reflectă scăderea fertilității solului. Bacteriile de fosfat solubile sunt foarte eficiente pentru creșterea plantelor P disponibile în sol, precum și creșterea și productivitatea plantelor de diferite culturi. Acidul humic îmbunătățește fertilitatea solului și productivitatea culturilor în mod eficient, în special solurile slab fertile și solurile alcalin-calcaroase. De asemenea, bacteriile rizosferice singure sau în asocieră cu acidul humic scad calciul activ cu 5 până la 20%.

Biomasa proaspatului vâstar format din lucerna, după un tratament asupra solurile calcaroase, cu rhizobacterii în combinație cu acizii humici a crescut de 10 ori.

The applied potassium humate also enhance the growth of alfalfa. Humic acids influence plant growth both in direct and indirect ways. Indirectly, they improve physical, chemical and biological conditions of soil (Katkat A. et al. 2009). Humic acids sequester (chelate) soluble calcium and protect the phosphates. The amine functional groups on humic acids can adsorb the phosphate anions also. Humic acid efficiently improves soil fertility and crop productivity on calcareous soils (Rajpar et al. 2011).

The biomass of alfalfa, after treatment of soils with microbial culture in combination with humic acids, was increased 10 times. This effect is combination of soil chemistry changes, as a result of applied humic acids, and different microbial metabolites, produced from isolated rhizospheric bacteria.

4. CONCLUSIONS

The presence of calcrete is basic reason for alkalization of the soil, structure changes and low concentrations of available P, Mg, and K. This negative effect along with lower content of organic carbon and nitrogen fractions have unfavourable impact on microbial soil community, which reflects to the decrease of soil fertility. Phosphate solubilising bacteria are very effective for increasing plant available P in soil as well as the growth and yield of various crop plants. Humic acid efficiently improves soil fertility and crop productivity, especially on poorly fertile and alkaline-calcareous soils. Also the rhizospheric bacteria alone or in combination with humic acid decrease the active calcium with 5 to 20 %.

The fresh shoot biomass of alfalfa, after treatment of calcareous soils with plant growth-promoting rhizobacteria in combination with humic acids was increased 10 times.

REFERENCES

REFERINȚE

- Awasthi R., Tewari R. și Nayyar H. 2011. Sinergia dintre Plante și microbii cu solubilizare P în soluri: Efectele asupra creșterii și fiziologiei recoltelor, *International Research Journal of Microbiology*, Vol. 2(12) pp. 484-503
- Brady N.C., Weil R.R. 2002. *Natura și Proprietățile Solurilor*. 14th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Bratkova S., Nikolova D., Evstatieva Y., Dimitrov I., Nikolova K. 2012, Analiza comunității de bacterii rizosferice în solurile afectate de formarea de calcret, *Jurnal de Explorări Geochimice* 119–120 44–50
- Dimitrov, I., Panaiotova, M., Koleva-Recalova, E., Atanasova, E. 2009. Observații geochimice și fizico-chimice inițiale în zonele afectate de calcetizare în câmpia tracică de est. *Ann. UMG*, 52, Part I – Geol. and Geophys., pp. 55-60.
- Goldstein A.H.1986. Solubilizarea bacteriană a fosfaților minerali: perspectivă istorică și viitoare. *Am. J. Altern. Agric.* 1:51–57.
- Hayat R. Ali S. Amara U. Khalid R. Ahmed I. 2010. Bacterii benefice pentru sol și rolul lor în promovarea creșterii plantelor: revizuire, *Ann Microbiol*, Springer-Verlag și Universitatea din Milano
- Katkat A., Çelik H., Turan M. and Aýk B. 2009. Efectele aplicațiilor solului și foliare ale substanțelor humice asupra absorbției de nutrient minerali ai grâului în condiții de sol calcaros, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2): 1266-1273,
- Lugtenberg B.J., Kamilova F. 2009: Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541–556.
- Oliveira C.A., Alves V.M.C. Marriel I.E., Gomes E.A., Scotti M.R. Carneiro N.P. Guimaraes C.T., Schaffert R.E., Sa´ N.M.H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome, *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 1782–1787.
- Rahman M., Soaud A., F. Darwish, Golam F. and Sofian-Azirun M. Growth and nutrient Synergy between Plants and P-Solubilizing Microbes in soils: Effects on Growth and Physiology of Crops, *International Research Journal of Microbiology*, Vol. 2(12) pp. 484-503
- Brady N.C., Weil R.R. 2002. *The Nature and Properties of Soils*. 14th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Bratkova S., Nikolova D., Evstatieva Y., Dimitrov I., Nikolova K. 2012, Analysis of rhizospheric bacterial community in soils affected by the formation of calcrete, *Journal of Geochemical Exploration* 119–120 44–50
- Dimitrov, I., Panaiotova, M., Koleva-Recalova, E., Atanasova, E. 2009. Initial geochemical and physicochemical observations in areas affected by calcetization in the East Thracian plane. *Ann. UMG*, 52, Part I – Geol. and Geophys., pp. 55-60.
- Goldstein A.H.1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1:51–57.
- Hayat R. Ali S. Amara U. Khalid R. Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growthpromotion: a review, *Ann Microbiol*, Springer-Verlag and the University of Milan
- Katkat A., Çelik H., Turan M. and Aýk B. 2009. Effects of Soil and Foliar Applications of Humic Substances on Dry Weight and Mineral Nutrients Uptake of Wheat under Calcareous Soil Conditions, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2): 1266-1273,
- Lugtenberg B.J., Kamilova F. 2009: Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541–556.
- Oliveira C.A., Alves V.M.C. Marriel I.E., Gomes E.A., Scotti M.R. Carneiro N.P. Guimaraes C.T., Schaffert R.E., Sa´ N.M.H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome, *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 1782–1787.
- Rahman M., Soaud A., F. Darwish, Golam F. and Sofian-Azirun M. Growth and nutrient

F. și Sofian-Azirun M. Creșterea și absorbția de nutrient a plantelor de porumb afectate de îngrășăminte cu sulf elementar și azot în solul calcaros nisipos, Jurnalul African de biotehnologie Vol. 10(60), pp. 12882-12889, 5 Octombrie, 2011

Rajpar I., Bhatti M., Zia-ul-hassan, Shah A. și Tunio S. 2011. Acidul humic îmbunătățește creșterea, producția și conținutul de ulei al Brassica campestris L. , Pak. J. Agri., Agril. Engg., Vet. Sci., 27 (2): 125-1

uptake of maize plants as affected by elemental sulfur and nitrogen fertilizer in sandy calcareous soil, African Journal of Biotechnology Vol. 10(60), pp. 12882-12889, 5 October, 2011

Rajpar I., Bhatti M., Zia-ul-hassan, Shah A. and Tunio S. 2011. Humic acid improves growth, yield and oil content of Brassica campestris L. , Pak. J. Agri., Agril. Engg., Vet. Sci., 27 (2): 125-133