



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 01378**

(22) Data de depozit: **21.12.2010**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:
• **FUNDAȚIA SAPIENTIA - UNIVERSITATEA SAPIENTIA, STR. MATEI CORVIN NR.4, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;**
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA PLANTELOR, BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8, SECTOR 1, 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;**

• **CONSTANTINESCU FLORICA, STR. EMANOIL PORUMBARU NR. 67, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MESZAROS ALEXANDRU, ALEEA CIOCĂRLIEI NR. 9, SC. B, AP. 19, MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **MATE SZILARD, STR. KOSSUTH LAJOS NR. 17/4, MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **LANYI SZABOLCS ȘTEFAN, STR. MIKO NR.21, MIERCUREA CIUC, HR, RO;**
• **LĂCĂTUȘU RADU, ȘOS. TITULESCU NR. 10, BL. 20, SC. B, AP. 74, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BURILEANU STANCIU MIHAELA MONICA, STR. I. V. PAVLOV NR. 94, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **LUNGU MIHAELA, STR. SIRENELOR NR. 17, AP. 1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU ȘI BIOFORTIFIERE CU SELENIU A RECOLTEI DE GRÂU ȘI SISTEM PENTRU SUPORTUL DECIZIEI DE APLICARE A ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă pentru determinarea necesității biofortifierii cu seleniu a unei recolte de grâu, și la procedeul de biofortifiere cu seleniu. Metoda constă în eșantionarea solului și recoltei dintr-o anumită zonă, analiza fizico-chimică a acestora, introducerea datelor privind conținutul de seleniu, factorii care influențează asimilarea Se, coordonatele locației într-o bază de date cuprinzând o bază de cunoștințe și o bază de fapte care sunt utilizate pentru a genera concluzii pe baza cărora utilizatorul ia decizia de

biofortifiere. Procedeul de biofortifiere, conform invenției, constă în aplicarea unor doze mici de seleniu chelatat în plasmolizat de drojdie, împreună cu rizobacterii care stimulează dezvoltarea plantelor și preluarea de Se, ca tratament al brazdei în care se introduc semințele de grâu, aplicarea făcându-se cu ajutorul unui echipament de pulverizare pe brazdă.

Revendicări: 2
Figuri: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



PROCEDEU DE BIOFORTIFIERE CU SELENIU A RECOLTEI DE GRÂU ȘI SISTEM PENTRU SUPTORUL DECIZIEI DE APLICARE A ACESTUIA

Prezenta invenție se referă la un procedeu de biofortifiere cu seleniu, aplicabil la cultura grâului și destinat creșterii valorii nutritive a recoltei de grâu provenite din zonele cu deficit de seleniu în sol, și la un sistem pentru suportul deciziei de aplicare a acestui procedeu de biofortifiere.

Sunt cunoscute mai multe procedee de biofortifiere cu seleniu a recoltei diferitelor plante de cultură, inclusiv grâu. Aceste procedee implică aplicarea diferitelor compoziții, pe bază de diferiți compuși ai seleniului, în diferite stadii de vegetație pentru creșterea nivelului de seleniu în recolta utilă. Procedeele / compozițiile dezvoltate au ca scop suplimentarea cu seleniu a lanțului alimentar din zonele cu deficit de seleniu și sunt destinate rezolvării problemelor tehnice rezultate din necesitatea aplicării foarte precise și uniforme a unor doze mici de compuși foarte toxici. Brevetul WIPO 99/29639 descrie o combinație de sare solubilă de seleniu (selenit, 6...36 g) și de uree (20..40 kg/ha). Această combinație este destinată aplicării foliare și are rolul de a asigura concomitent suplimentarea nutriției cu seleniu și cu azot. Tratamentul foliar cu această compoziție diluată în volumul de apă corespunzător normelor de aplicare permite distribuirea uniformă a dozelor mici de compuși, dar cercetările efectuate (trecute recent în revistă de Zu *et al.*, 2009, Trends in Plant Science, 14, 436-442) au arătat că selenitul aplicat foliar are o rată mică de translocare în recolta utilă (boabele) de grâu.

Brevetul SUA 6058648 se referă la o compoziție, pe bază de săruri solubile de seleniu (de ex. selenat de sodiu) și polimeri hidrosolubili (de ex. amestec de poliacetat de vinil/dextrină sau copolimer de acetat de vinil / etilenă), destinată tratării semințelor. Aplicarea ca tratament al seminței permite de asemenea o distribuire uniformă a unor doze mici de produs, iar selenatul aplicat radicular este translocat prin floem și se acumulează sub formă de compuși organo-seleniați în bobul de grâu format din plante astfel tratate. Inșă selenatul de sodiu afectează germinația semințelor unora din varietățile de plante cultivate (inclusiv a celor de grâu), ca și creșterea și dezvoltarea sistemului radicular. De asemenea selenatul aplicat ca tratament al seminței poate influența eficacitatea produselor de protecția plantelor aplicate ca tratament la sămânță.

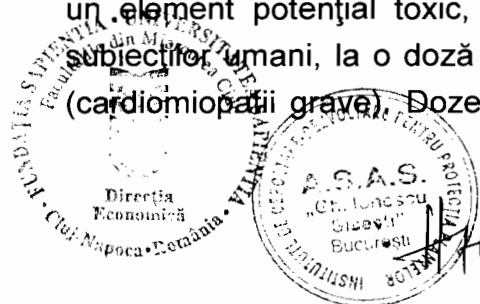
Pentru a reduce fenomenele de fitotoxicitate asociate aplicării formelor solubile de seleniu brevetul WO/2009/111986 revendică prepararea unei nanostructuri de fertilizant seleniat cu eliberare controlată. Procedeu de preparare implică amestecul unei roci carbon-silicioase, care conține 30...95%

nanoparticule și în care conținutul de seleniu este mai mare de 0,5g/kg, cu un lichid cu pH 8-10, obținut din dizolvarea în apă a KOH, K₂CO₃ și 20% amoniac în proporție de 10:1:2. Brevetul nu prezintă procedee prin care să se asigure aplicarea uniformă a acestui revendicat nano-fertilizant pe bază de seleniu. De asemenea brevetul nu furnizează informații referitoare la biodisponibilitatea speciilor de seleniu eliberate controlat din structura fertilizantului.

Pentru a mări biodisponibilitatea seleniului introdus în sol brevetul CN 10126011 prezintă o compoziție pe bază de 40...60% acid humic, 5...20% selenit de sodiu și 20...40% bioxid de siliciu. Brevetul nu descrie procedee de aplicare uniformă a acestei compoziții (în doze care sunt de ordinul kg per ha). Studiile recente (Chopin *et al.*, 2009, European Journal of Soil Science, 60, 369-376) au demonstrat că acizii humici cresc gradul de adsorbție a selenitului pe complexii din sol, reducând nivelul de regăsire a acestuia în soluția solului (de unde este preluat de sistemul radicular al plantelor). Deci acizii humici pot în unele tipuri de sol să reducă biodisponibilitatea seleniului.

Pentru a se asigura formarea unei recolte de grâu cu un conținut ridicat de seleniu brevetul CN 101347074 propune un procedeu în care se aplică fertilizanți cu seleniu atât ca tratament la sol, cât și ca tratament foliar. Inițial, înainte de semănatul grâului, se aplică la sol o doză de 10...20 kg/mu (echivalent 150...300 kg/ha) de fertilizant solid, obținut din 30... 50 părți bagasă, 0,5 ... 2 părți selenit de sodiu și 2...5 părți de sulfat de amoniu. Tratamentul foliar se face cu un amestec de selenit de sodiu, sulfat de amoniu și fosfat monopotasice, în proporție de 1:1:1 Amestecul descris se aplică în concentrații cuprinse între 0,05% ...2%, de trei ori în timpul vegetației grâului: la înfrățire, la începutul perioadei de formare și maturare a boabelor și la mijlocul perioadei de formare și maturare boabelor. Aplicarea uniformă a 150...300 kg de fertilizant solid pe un ha nu se poate realiza decât prin utilizarea intensivă a unei forțe de muncă extrem de conștiincioase, neexistând dispozitive pentru aplicarea mecanizată a unei cantități atât de reduse. Așa cum s-a arătat și mai sus selenitul aplicat foliar are o rată mică de translocare în boabele de grâu; aplicarea concomitentă de sulfat reduce suplimentar metabolizarea selenitului de sodiu aplicat foliar, seleniul competiționând cu sulful pentru încorporarea în (Se) cisteină, (Se) metionină și (Se) cistină.

Un dezavantaj comun al tuturor brevetelor de mai sus este faptul că nu includ praguri limită pentru încărcarea cu seleniu a diferitelor zone. Seleniul este un element potențial toxic, cu o fereastră fiziologică foarte îngustă. În cazul subiecților umani, la o doză zilnic ingerată (RDI) de 20 μg/zi se produc carențe (cardiomiopatii grave). Dozele mai mici de 40 μg/zi sunt asociate unor creșteri



S.S.A.S.
„Ch. Ionescu
Stăvilă”
București

AA

semnificative ale incidenței unor boli cronice. La o ingerare (supraoptimală) de 200 $\mu\text{g}/\text{zi}$ se reduce incidența a numeroase cancere, iar RDI care produce intoxicație cronică este considerată de OMS ca fiind de 400 $\mu\text{g}/\text{zi}$. Practic există un singur ordin de mărime între valorile benefice și cele toxice, iar aplicarea oricărui procedeu de suplimentare a lanțului alimentar trebuie asociată cu un sistem corespunzător de suport al deciziei, care să includă și un subsistem de managementul riscurilor de supradozare.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un sistem de aplicare uniformă a unor doze foarte mici de compuși ai seleniului, care să includă măsuri de limitare a fenomenelor de fitotoxicitate și de menținere a unei biodisponibilități ridicate a seleniului adăugat, și a cărui aplicare să se bazeze pe un sistem informatic de suport al deciziei.

Procedeu de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Realizarea unui volum de 9...22 l de soluție de aplicare prin dizolvarea în apă proaspătă de fântână, încălzită la temperatura mediului ambiant, a cantităților substanțe corespunzătoare următoarelor concentrații: 3,0g/l zaharoză; 0,5g/l K_2HPO_4 ; 0,2g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g/l NaCl; 7 g/l plasmolizat de drojdie suplimentat cu 100 ± 5 mg Se/100 plasmolizat 0,5g/l glutamat de sodiu; 0,2g/l K_2MoO_4 ;
- ✓ Aducerea peste soluția preparată ca mai sus a unui volum de 900 ... 2200 ml de suspensie de bacterii inoculante, *Serratia plymuthica* Ps33 sau *Bacillus amiloliquefaciens* B100, cu un conținut de min. 10^8 ufc/ml,
- ✓ Diluarea în suspensiei de microorganisme în soluție de aplicare cu apă proaspătă de fântână până la realizarea unor norme de aplicare cuprinse între 90...220 l/ha și aplicarea suspensiei rezultate în brazdă concomitent cu semănatul, prin utilizarea de echipamente agricole specifice de aplicare soluții în brazdă, la presiuni de lucru cuprinse între 0,5 ... 3 bar a echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.

Sistemul de suport al deciziei de aplicare a procedurii de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu conform invenției este alcătuit dintr-o bază de cunoștințe, care conține acele informații și proceduri care provin de la expert, printr-un modul de achiziție a cunoașterii, o bază de fapte prin care utilizator sistemului expert furnizează datele particulare proprii, un mecanism de



[Handwritten signature]

21-12-2010

interferență prin care baza de date și baza de fapte sunt utilizate pentru generarea unei concluzii, care este compilată prin modulul explicativ și apoi transferată interfeței cu utilizatorul.

În particular modulul de achiziție a cunoștințelor conține :

- Datele privind seleniul din sol al zonei considerate (seleniu total din sol și seleniu mobil);
- Datele privind factorii solului care influențează asimilarea seleniului de către planta de grâu (pH);
- Date privind conținutul de seleniu în recolta de grâu.
- Limitele pentru domeniul parametrului considerat, conform căreia se ia decizia de intervenție pentru suplimentarea lanțului alimentar cu seleniu.
- Procedurile de prelucrare a datelor pentru adaptare la stocare și luare de decizii de către motorul de inferență.

Procedeul de biofortifiere conform invenției are următoarele avantaje:

- aplicarea ca suspensie apoasă și folosirea ca agent de diluare a apei de fântână, material larg accesibil, fapt care asigură uniformitatea dozei de seleniu aplicate;
- limitarea fitotoxicității seleniului prin reducerea dozelor și complexarea respectivei cantități de seleniu într-un suport de plasmolizat de drojdie, suport recunoscut și larg utilizat pentru reducerea toxicității seleniului;
- menținerea unei biodisponibilități ridicate a diferitelor specii de seleniu, prezente în sol sau formate ca urmare a aplicării compoziției de mai sus, datorită inoculării în brazdă cu tulpini de bacterii care au o acțiune dovedită de menținere a unei biodisponibilități ridicate a seleniului prin echilibrul indus între speciile moleculare de fosfor și sulf din soluția solului, care, pe de o parte competiționează cu speciile de seleniu pentru sistemele de transport activ în celulele radiculare ale plantelor, iar pe de altă dezlocuiesc speciile de seleniu adsorbite pe complexii organo-minerali din sol;
- lipsa de interacție dintre compoziția aplicată pe sol, conținând seleniu și microorganisme inoculante, și produsele de protecția plantelor aplicate ca tratament al seminței întrucât aplicarea compoziției se face pe brazdă;
- favorizarea acțiunii microorganismelor inoculante atât asupra solului cât și asupra plantei de cultură datorită aplicării pe brazdă în momentul semănatului;

Sistemul de suport al deciziei de aplicare a procedurii de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu prezintă următoarele avantaje:

Nu necesită intervenția expertului pentru luarea deciziei de biofortifiere a lanțului alimentar;



[Handwritten signature]

- Dă soluția de biofortifiere în funcție de situațiile particulare generate de către utilizator;
- Din partea utilizatorului necesită doar localizarea pe hartă (cunoștințe elementare de geografia zonei de interes);
- Este flexibilă expertul putând modifica numărul variabilelor de decizie cu generarea de răspunsuri pentru cazurile generate.

În continuare invenția va fi descrisă în detaliu, cu referire și la figura 1, care reprezintă schema de principiu a sistemului expert pentru luarea deciziei de biofortifiere.

Exemplu. Datele necesare pentru suportul deciziei de biofortifiere sunt obținute prin procedee de eșantionare și analiză în laborator a solului și recoltei din zona considerată, cu localizarea precisă a recoltării prin coordonatele eșantionării (coordoanate geografice, sau proiecție). Eșantioanele georeferențiate prin coordonate sau proiecții sunt sursele primare pentru informație. Cu aceste informații se obțin prin interpolare Kriging distribuțiile pe teritoriul considerat al parametrilor considerați ca variabile de decizie (pH, Se total din sol, Se mobil din sol, Se total din recolta de grâu). Cu ajutorul limitelor parametrilor se determină domeniile pentru care valoarea parametrului respectiv este acceptat corespunzător sau necorespunzător (valoarea 1 sau 0), rezultând pentru fiecare parametru câte o hartă (proiecție), cu zone pentru valoarea 0 sau 1. Luând în considerare n parametri ca variabile de decizie, rezultă 2^n situații, pentru care trebuie generat câte o procedură de intervenție. Prin suprapunerea hărților se obține o hartă rezultantă, cu o scară de la 0 la 2^n-1 a parametrilor de decizie. Cu ajutorul valorilor binare obținute pentru fiecare parametru, se generează valoarea parametrului de decizie (caz). Cu ajutorul tabelului de proceduri de intervenție se obțin cele 2^n răspunsuri ale sistemului expert (funcția de transfer al mecanismului de inferență). Pentru fiecare pixel al hărții rezultante va exista un răspuns al sistemului expert. Harta rezultată este stocată în baza de cunoștințe.

Prin interfața cu utilizatorul se introduce de către utilizator locul de pe hartă pentru care se solicită răspunsul sistemului expert. Acest loc se traduce în mecanismul de inferență prin localizarea pe harta rezultantă din hărțile parametrilor considerate ca variabile de decizie (valori de la 0 la 2^n-1). Mecanismul de inferență va genera răspunsul sistemului, prin funcția de transfer. Răspunsul este trimis către interfața cu utilizatorul prin modulul explicativ, ca un mesaj scris.

În cazul în care este necesară biofortifierea cu seleniu se aplică următorul procedeu. Se realizează un volum de 9...22 l de soluție de aplicare prin dizolvarea în apă proaspătă de fântână, încălzită la temperatura mediului



ambiant, a cantităților substanțe corespunzătoare următoarelor concentrații: 3,0g/l zaharoză; 0,5g/l K_2HPO_4 ; 0,2g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1g/l NaCl; 7 g/l plasmolizat de drojdie suplimentat cu 100 ± 5 mg Se/100 plasmolizat 0,5g/l glutamat de sodiu; 0,2g/l K_2MoO_4 .

Plasmolizatul seleniat de drojdie se realizează după cum urmează: 500 părți drojdie pentru panificație (26% substanță uscată) se emulsionează cu 2 400 ... 2 500 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 metabisulfit de sodiu ($Na_2S_2O_5$), iar după 30 min se adaugă 16 ... 18 părți selenat de sodiu (Na_2SeO_4). Se omogenizează la presiune medie (150 ... 200 bari) și se deshidratează prin atomizare la temperatură joasă (130 ... 140°C intrare agent uscare, 70 ... 75°C ieșire agent uscare).

Peste soluția preparată ca mai sus se aduce un volum de 900 ... 2200 ml de suspensie de bacterii inoculante, *Serratia plymuthica* Ps33 sau *Bacillus amiloliquefaciens* B100, cu un conținut de min. 10^8 ufc/ml,

Suspensia de microorganisme de mai sus se diluează în soluție de aplicare cu apă proaspătă de fântână până la realizarea unor norme de aplicare cuprinse între 90...220 l/ha. Se aplică suspensia rezultată în brazdă concomitent cu semănatul, prin utilizarea de echipamente agricole specifice de aplicare soluții în brazdă, la presiuni de lucru cuprinse între 0,5 ... 3 bar a echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.



Handwritten signature

PROCEDEU DE BIOFORTIFIERE CU SELENIU A RECOLTEI DE GRÂU ȘI SISTEM PENTRU SUPTORUL DECIZIEI DE APLICARE A ACESTUIA

Revendicări

1. Procedeu de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: realizarea unui volum de 9...22 l de soluție de aplicare prin dizolvarea în apă proaspătă de fântână, încălzită la temperatura mediului ambiant, a cantităților substanțe corespunzătoare următoarelor concentrații: 3,0g/l zaharoză; 0,5g/l K_2HPO_4 ; 0,2g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1g/l NaCl; 7 g/l plasmolizat de drojdie suplimentat cu 100 ± 5 mg Se/100 plasmolizat 0,5g/l glutamat de sodiu; 0,2g/l K_2MoO_4 ; aducerea peste soluția preparată ca mai sus a unui volum de 900 ... 2200 ml de suspensie de bacterii inoculante, *Serratia plymuthica* Ps33 sau *Bacillus amiloliquefaciens* B100, cu un conținut de min. 10^8 ufc/ml; diluarea suspensiei de microorganisme în soluție de aplicare cu apă proaspătă de fântână până la realizarea unor norme de aplicare cuprinse între 90...220 l/ha și aplicarea suspensiei rezultate în brazdă concomitent cu semănatul, prin utilizarea de echipamente agricole specifice de aplicare soluții în brazdă, la presiuni de lucru cuprinse între 0,5 ... 3 bar a echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h.

2. Sistemul de suport al deciziei de aplicare a procedurii de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că este alcătuit dintr-o bază de cunoștințe, care conține acele informații și proceduri provenind de la expert, printr-un modul de achiziție a cunoașterii conținând datele privind seleniul din sol al zonei considerate (seleniu total din sol și seleniu mobil); datele privind factorii solului care influențează asimilarea seleniului de către planta de grâu (pH); date privind conținutul de seleniu în recolta de grâu; limitele pentru domeniul parametrului considerat, conform căreia se ia decizia de intervenție pentru suplimentarea lanțului alimentar cu seleniu, o bază de fapte prin care utilizator sistemului expert furnizează datele particulare proprii, un mecanism de interferență prin care baza de date și baza de fapte sunt utilizate pentru generarea unei concluzii, care este compilată prin modulul explicativ și apoi transferată interfeței cu utilizatorul.



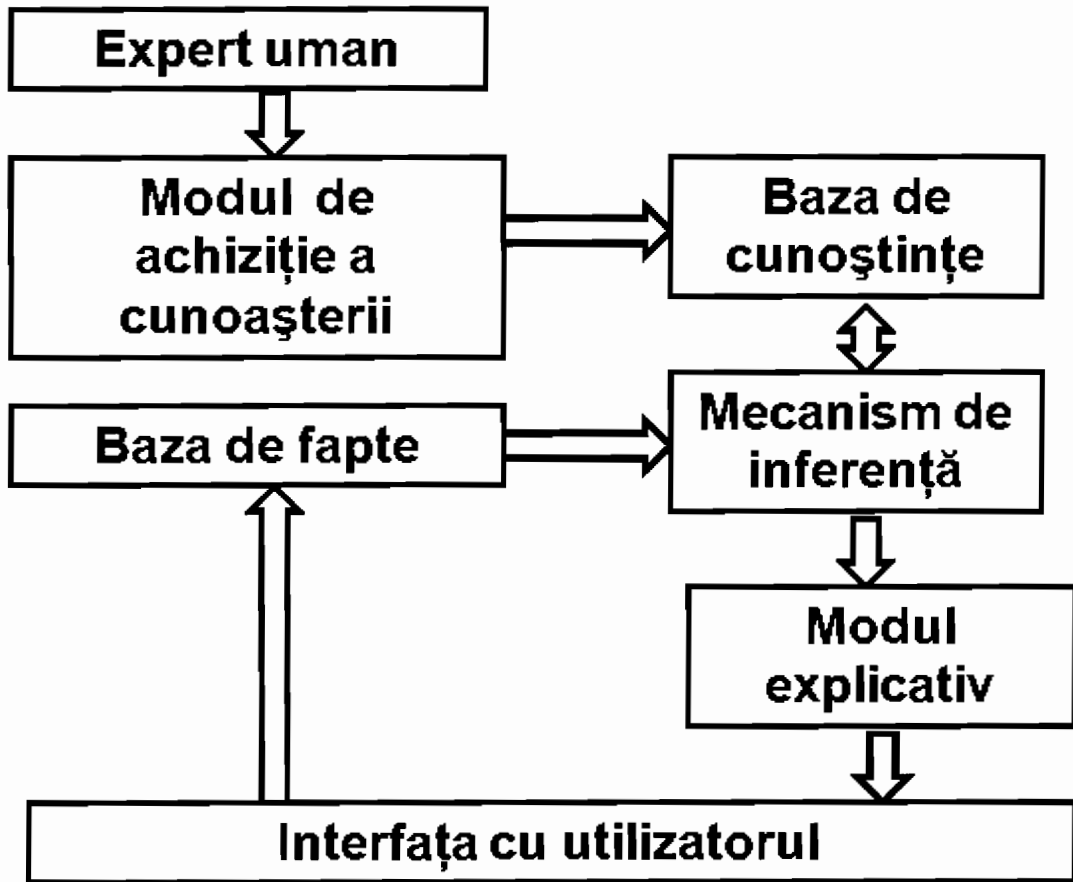


Figura 1. Schema de principiu a sistemul expert pentru luarea deciziei de biofortifiere



[Handwritten signature]

[Handwritten initials]