



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00858**

(22) Data de depozit: **18/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2020** BOPI nr. **10/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(73) Titular:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **GEORGESCU FLORENTINA,
STR. INDEPENDENȚEI NR.5, BL.6, SC.A,
AP.7, RÂMNICU-VÂLCEA, VL, RO;**

• **GEORGESCU EMILIAN,
STR. INDEPENDENȚEI NR. 5, BL. 6, SC. A,
AP. 7, RÂMNICU-VÂLCEA, VL, RO;**
• **VLĂDULESCU CONSTANTIN-MARIUS,
STR. VORONEȚ NR. 3, BL. D4, SC. 1, ET. 1,
AP. 5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GEORGETA ISTRATE,
STR. TEODOSIE RUDEANU NR. 3, BL. 1C,
SC. 3, AP. 79, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **VLĂDULESCU LUCIAN-CONSTANTIN,
STR. ELEFTERIE NR. 31, AP. 1, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**US 2008302152 A1; US 2004261481 A1;
L. CANELLAS, F. OLIVARES, N. AGUIAR,
D. JONES, A. NEBBIOSO, P. MAZZEI, A.
PICCOLO, "HUMIC AND FULVIC ACIDS AS
BIOSTIMULANTS IN HORTICULTURE",
SCIENTIA HORTICULTURAE, VOL. 196,
PP. 15-27, 2015**

(54) **PROCEDEU DE FORMULARE A EXO-SEMNALELOR
HIDROFOBE SPECIFICE RIZOSFEREI**



RO 132516 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de formulare a (bio)moleculelor hidrofobe,
care sunt exo-semnale cu rol de comunicare pentru reglarea interacțiilor tripărțite din
3 rizosferă, plante de cultură (rădăcini) - (micro)organisme benefice - (micro)organisme
dăunătoare.

5 Sunt cunoscute o serie de bio-molecule hidrofobe, care acționează ca exo-semnale
(semio-chimicale), fiind implicate în recunoașterea partenerilor interacțiilor din rizosferă,
7 plante de cultură (rădăcini) - (micro)organisme benefice - (micro)organisme dăunătoare.
Aceste exo-semnale hidrofobe sunt secretate în mediul predominant hidrofil al rizosferei,
9 determinând declanșarea unor răspunsuri specifice la partenerul receptor. Simbiozele
fixatoare de azot implică un dialog între rădăcinile plantelor și rhizobii, mediat de către
11 flavonoide hidrofobe (produse de rădăcinile plantelor) și de factorul Nod mitogen specific, de
natură lipochitooligozaharidică, produs de rhizobii (**Cooper, 2007, Journal of Applied
13 Microbiology, 103, 1355-1365**). Ciupercile de micoriză produc și ele un factor mitogen
lipochitooligozaharidic, Myc factor, (**Maillet et al. 2011, Nature, 469, 58-63**). Activitatea
15 biologică a acestor compuși amfifili este însă definită de porțiunea hidrofobă, pentru care s-
au identificat kinaze specifice cu funcțiune similară receptorilor (**Malkov et al. 2016,
17 Biochemical Journal, 473, 1369-1378**).

19 Strigolactonele, un grup de derivați caretonoidici/lactone sequisterpenice puternic
hidrofobe, produse de rădăcinile plantelor, stimulează germinarea sporilor ciupercilor de
micoriză, cu ramificarea hifelor (**Akiyama et al. 2005, Nature, 435, 824-827**), modifică tiparul
21 de dezvoltare și de ramificare al ciupercilor fitopatogene (**Dor et al. 2011, Planta, 234, 419-
427**) și favorizează formarea nodulilor fixatori de azot pe rădăcinile leguminoaselor (**Soto et
23 al. 2010, Soil Biology and Biochemistry, 42, 383-385**). În același timp, strigolactonele sunt
percepute și de semințele plantelor parazite, ca un indicator al prezenței plantelor gazdă,
25 inducând germinarea semințelor respectivelor plante parazite, la momentul oportun
parazitării (**Matusova et al. 2005, Plant Physiology, 139, 920-934**).

27 Monomerii de cutină, (poli)alcooli grași ramificați, au și ei rol în formarea simbiozelor
micorizale (**Murray et al. 2013, Molecular Plant, 6, 1381-1383**), fiind implicați, în același
29 timp și în stimularea dezvoltării apresorilor oomicetelor fitopatogene (**Wang et al. 2012,
Current Biology, 22, 2242-2246**). Sorgoleonele, componentul major al exsudatelor
31 hidrofobe ale plantelor de sorg, acționează atât ca inhibitori ai proceselor de nitrificare din
sol, crescând eficiența utilizării azotului (**Subbarao et al. 2013, Plant and Soil, 366, 243-
33 259**), cât și ca alomoni implicați în interacții alelopatice, cu efect erbicid pentru alte plante
(**Einhellig și Souza, 1992, Journal of Chemical Ecology, 18, 1-11**). Plantele secretă
35 compuși care mimează N-acil-homoserin-lactonele bacteriene (**Teplitski et al. 2000,
Molecular Plant-Microbe Interactions, 13, 637-648**), exo-semnale hidrofobe implicate în
37 comunicarea din cadrul comunităților microbiene și în reglarea concertată a exprimării
genelor (**Fuqua et al. 2001, Annual Review of Genetics, 35, 439-468**). Percepția de către
39 plante a N-acil-homoserin-lactonelor, ca un indicator al prezenței microorganismelor/un tipar
molecular asociat microbilor (MAMP, microbe-associated molecular pattern), determină o
41 serie de efecte benefice, inclusiv amorsarea sistemului de apărare din plante (**Schikora et
al. 2016, Plant Molecular Biology, 90, 605-612**).

43 Sunt cunoscute documente de brevet prin care au fost revendicate diferite utilizări
agronomice, pentru majoritatea acestor bio-molecule exo-semnal hidrofobe și/sau pentru
45 analogii lor/compuși bio-mimetici. Documentul de brevet **EP 0245931** descrie diferite flavone
substituite, ca de exemplu 7,4'-dihidroxi-flavonă, 7,4'-dihidroxi-3'-metoxi-flavonă și 4'-hidroxi-7-
47 metoxi-flavonă, din extractul de trifoi, care sunt inductori ai genelor implicate în nodularea de

RO 132516 B1

la *Rhizobium trifolii*. Documentul de brevet **US 5229113** prezintă o serie de izoflavone, daidzein, genistein, 7-hidroxi-isoflavonă, 5,7-dihidroxi-isoflavonă, biochanina A, formonone-tină și prunetină, ca și compuși flavonoidici, care includ 4',7-dihydroxiflavona, apigenina, kaempferolul și coumestrolul, extrase din plante de soia, care sunt inductori ai genelor de nodulare de la *Bradyrhizobium japonicum*. Documentul de brevet **FR 2660658** revendică un compus cu o structură lipo-polizaharidică similară factorului Nod produs de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* și *Azorhizobium*, care acționează ca factor semnal favorizând formarea simbiozelor fixatoare de azot. Brevetul **US 9241454 B2** protejează utilizarea unei structuri lipochitooligozaharidică, cu un lanț acil saturat sau mononesaturat, conținând 16 sau 18 atomi, pentru stimularea formării simbiozelor micorizale.

Întrucât sinteza sorgoleonelor este laborioasă și scumpă, iar extragerea lor din exsudatele radiculare este limitată, au fost realizate și brevetate procedee de sinteză a unor compuși hidrofobi natural identici/biosimilari strigolactonelor alelopate, cu acțiune erbicidă, prin transformarea oleoresinei din coajă de nucă caju (**US 9447010 B2**).

US 8101171 B2 se referă la utilizarea strigolactonelor naturale, strigoi, alectrol, sorgolactone, orobanchol, sau a analogilor lor sintetici GR7, GR24, dimetilsorgolactone, pentru intensificarea interacției simbiotice dintre ciupercile producătoare de endo-micorize (AM) și plantele cultivate. Brevetul revendică aplicarea repetată a strigolactonelor care stimulează/intensifică interacția simbiotică AM - rădăcinile plantelor de cultură, dar nu exemplifică modalitatea concretă prin care se realizează această aplicare repetată. Cererea de brevet **WO 2013034621 A1** dezvăluie folosirea, ca tratament în brazdă sau ca tratament al seminței, a unor derivații ai acil-homoserin lactonelor, pentru creșterea randamentului culturilor agricole, conținutului de clorofilă al plantelor, germinarea semințelor, preluarea nutrienților și interacțiile simbiotice micorizale.

O problemă tehnică care limitează utilizarea eficientă a acestor exo-semnale hidrofobe în tehnologiile de cultivare a plantelor este determinată de solubilitatea redusă a unor astfel de compuși în apa utilizată pentru aplicarea unor tratamente în agricultură, și care reprezintă vehiculul de transfer către mediul predominant hidrofil specific rizosferei plantelor de cultură. Nu au fost descoperiți decât un număr limitat de compuși naturali care cresc solubilitatea în apă a acestor exo-semnale (semiochimicale) hidrofobe, și care sunt secretați inclusiv de organismul receptor. În cazul flavonoidelor hidrofobe solubilitatea lor este crescută de către ciclosoforoaze (beta-glucani ciclici), produse de rhizobiile - receptori ai respectivelor exo-semnale hidrofobe (**Lee et al. 2003, Antonie van Leeuwenhoek, 84, 201-207**). Compuși din clasa beta-glucanilor ciclici au fost puși în evidență ca fiind produși și de tulpina *Paenibacillus graminis* FL400 (NCAIM B001365), care favorizează formarea simbiozelor fixatoare de azot (**RO 125651 B1**).

A fost descrisă utilizarea ciclodextrinelor pentru creșterea solubilității în apă a compușilor hidrofobi. Mecanismul este similar cu cel al beta-glucanilor ciclici. Ciclodextrinele formează complecși de incluziune cu compușii hidrofobi, pe care îi sechestrează în interiorul hidrofob. Astfel de compuși de incluziune au fost propuși pentru creșterea solubilității medicamentelor hidrofobe (**Loftsson și Brewster, 1996, Journal of Pharmaceutical Sciences, 85, 1017-1025**), biocidelor (**Nardello-Rataj și 2014, Beistein Journal of Organic Chemistry, 10, 2603-2622**) sau a regulatorilor de creștere pentru plante (Cerere de brevet **JP 2013241384 A**). Ciclodextrinele sunt însă relativ scumpe și au o stabilitate redusă în sol, datorită unei biodegradabilități semnificative (**Fenyvesi et al. 2005, Chemosphere, 60, 1001-1008**).

RO 132516 B1

1 Alte soluții tehnice sunt cele de condiționare a exo-semnalelor hidrofobe sub forma
2 unor concentrate emulsionabile. Cererea de brevet **EP 3060561 A1** revendică și o formulare
3 a strigolactonelor (de biosinteză sau analogi sintetici) de tip concentrat emulsionabil, în care
4 strigolactonele sunt dizolvate într-un alcool, metanol, etanol, propanol, iso-propanol, and
5 butanol, emulsionat cu un surfactant, sulfosuccinat, sulfonat de naftalenă, ester sulfat, ester
6 fosfat, alcool sulfatat, sulfonat de alchil benzen, policarboxilat, condensat de sulfonat de
7 naftalene, condensat de acid fenol sulfonic, lignosulfonat, laurat de metil oleat, alcool polivi-
8 nilic sau orice combinație dintre acești surfactanți. Formulările de tip concentrat emulsionabil
9 au însă o serie de dezavantaje: suprautilizare a ingredientului activ, necesar pentru a genera
10 gradientul de concentrație implicat în difuzarea din solvent în mediu apos; riscul de
11 supradozare sau de sub-dozare datorită erorilor de amestecare și/sau de calibrare; afectarea
12 suprafețelor de material plastic sau de cauciuc de către solvenți; distrugerea straturilor de
13 lacuri și vopsele care protejează metalele diferitelor utilaje și echipamente agricole împotriva
14 coroziunii; efect coroziv al solvenților în unele situații; inflamabilitatea, care complică
15 manipularea.

16 Un alt dezavantaj al acestor formulări de tip concentrat emulsionabil, specific pentru
17 semiochimicalele hidrofobe din rizosferă, este determinat de stabilitatea redusă în mediu
18 apos a unor astfel de compuși, ca de ex. strigolactonele. Pentru a limita pierderilor de
19 substanță activă în soluțiile/emulsiile apoase utilizate pentru stropit, cererea de brevet
20 **US 20160198714 A1** descrie utilizarea unor solvenți neapoși, polari, de tipul alcoolilor,
21 dialchil cetonelor, carbonatului de alchilene, esterilor alchilici și esterilor arii, sau combinații
22 ale acestora, sau semi-polari, ca de ex. polietilenglicol, pentru formularea unor factori de
23 creștere pentru plante, majoritatea puternic hidrofobi. Cererea de brevet **EP 2949215** pre-
24 zintă utilizarea unui amestec de iso-flavone, dizolvate într-un purtător acceptabil din punct
25 de vedere agronomic, pentru tratamentul seminței leguminoaselor, în vederea favorizării
26 formării simbiozelor fixatoare de azot. Formulările descrise mai sus protejează semnificativ
27 numai compușii hidrofobi instabili în mediu apos care sunt aplicați ca tratament al seminței.

28 În rizosferă compușii hidrofobi secretați de către rădăcinile plantelor/diferitele
29 (micro)organisme sunt protejați prin închidere în buzunarele hidrofobe ale materiei organice,
30 respectiv în structurile supra-moleculare amfile de acizi humici (**Canellas et al. 2015,**
31 **Scientia Horticulturae, 196, 15-27**). Materia organică din sol, care include acizi humici,
32 formează astfel o structură care poate fi considerată analoagă uneia logistice, de preluare,
33 depozitare și transport a diferitelor semnale hidrofobe (**Lehmann și Kleber, 2015, Nature,**
34 **528, 60-68**).

35 Acizii humici sunt cunoscuți pentru formularea diferitelor inputuri utilizate în
36 tehnologiile de cultură a plantelor. De exemplu brevetul **SUA 9073796 B1** dezvăluie o
37 combinație de acizi humici și fertilizanti, obținută prin amestecarea lignitului cu azot lichid,
38 adăugarea, în etape, de acid fosforic, apă și potasiu, filtrarea amestecului și separarea
39 filtratului. Până în prezent însă nu a fost descrisă utilizarea acizilor humici pentru formularea
40 semiochimicalelor/exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă.

41 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția o reprezintă obținerea de biomolecule
42 hidrofobe, prin creșterea gradului de încărcare cu compuși hidrofobi ai acizilor humici extrași
43 din turba oligotrofă.

44 Procedul de formulare a bio-moleculelor hidrofobe, inlatura dezavantajele de mai
45 sus prin aceea ca este alcătuit din următoarele etape: humificarea suplimentară și hidrofobi-
46 zarea turbei oligotrofe, adusă la 25% umiditate, prin tratare în câmp de microunde prin
47 încălzire timp de 20 min, de la 400...500 W, la temperaturi de maximum 92°C; amestecarea
48 timp de 12 h a 1 parte de turbă oligotrofă hidrofobizată cu 5 părți într-o soluție de KOH 0,5M,
49 la 35°C pentru extracția acizilor humici și fulvici; precipitarea acizilor humici prin aducerea

RO 132516 B1

pH-ului soluției la pH 2,5 cu acid fosforic 85% și recuperarea acizilor humici prin filtrare; 1
resuspendarea acizilor humici în tampon citrat de sodiu-acid citric 0,1 M, în raport de 1 parte 3
acid citric la 4 părți tampon, și adăugarea compuși hidrofobi, în raport de 0,02...1 la 100 părți 5
acid humic; omogenizarea amestecului de acizi humici, prin trecerea repetată de 3 ori, printr-un micro-fluidizator cu camere ceramice, la o rată de 15 ml/min și la presiune de 140...150 MPa.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje: 7

- permite condiționarea diferitelor tipuri de exo-semnale hidrofobe, într-o formulă de acizi humici foarte compatibilă cu diferite tratamente la sol-stropiri directe, tratamente în brazdă, tratamente ale seminței; 9

- crește gradul de încărcare cu compuși hidrofobi ai acizilor humici extrași din turba oligotrofă, datorită creșterii indicelui de hidrofobicitate; 11

- protejează compușii exo-semnal prin închiderea în buzunarele hidrofobe, neaccesibile apei, din cadrul structurilor supra-moleculare de acizi humici; 13

- asigură o eliberare controlată de factori de mediu, respectiv exsudatele radiculare acide ale rădăcinilor plantelor, care determină schimbări conformaționale, cu expunerea parțială a buzunarelor hidrofobe la structuri hidrofobe ale rizoplanului plantelor; 15 17

- reduce riscul supradozării datorită diluării semnificative a ingredientelor active în produsul formulat, la maximum 1%; 19

- nu prezintă riscuri de inflamabilitate, coroziune, sau de afectare a suprafețelor de material plastic sau cauciuc. 21

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplul 1 23

500 g de turbă oligotrofă blondă, adusă la o umiditate de 25%, și cu o granulație de 1...5 mm (Klassman TS 3 fin, Klasmann-Deilmann, Geeste, Germania) se introduce într-un reactor de sticlă pyrex de 5 l, prevăzut cu capac cu gât rodat. Se fixează capacul pe reactorul de sticlă cu cleme de teflon, și se montează cu într-un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem, Neyron, Franța), cu gâtul rodat în sus, în afara incintei iradiate cu microunde. Pe gâtul rodat se fixează un refrigerent spiralat, care se ancorează pe diagonală de 2 din picioarele de sprijin ale stativului de susținere a reactorului cu microunde. Se încălzește timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400...500 W, la temperaturi de maximum 92°C. Se scoate flaconul de sticlă cu turba hidrofobizată, se răcește și se trece pe o baie de apă termostată și cu agitare (Lab Companion 37 L, Cole Parmer, Vernon Hills, SUA). Se adaugă 2,5 l de soluție KOH 0,5 M. Se menține la 35°C, sub ușoară agitare (5 rpm) timp de 12 l. Se separă humina ne-extrasă de acizi humici și fulvici prin filtrare. Filtratul se trece într-un reactor de sticlă de 5 l și se aduce la pH 2,5 cu acid fosforic 85%. Cele 25 g de acizi humici precipitați se recuperează prin filtrare. Se trec acizi humici recuperați într-un flacon erlenmeyer de 250 ml și se resuspendă în 100 ml tampon citrat de sodiu - acid citric 0,1 M. Peste amestecul de acizi humici tampon citrat se aduc 5 mg de GR24, (3E,3aR,8bS)-3-[[2S-4-metil-5-oxo-2H-furan-2-il]oximetiliden]-4,8-dihidro-3aH-indeno[1,2-b]furan-2-onă, analog sintetic de strigolactone. Amestecul de acizi humici și GR24 în tampon citrat se omogeneizează prin trecerea repetată de 3 ori, printr-un micro-fluidizator cu camere ceramice (LM10, Microfluidics, Westwood, SUA), la o rată de 15 ml/min și la presiuni de 140...150 MPa. 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43

Exemplul 2

Se lucrează la fel ca în exemplul 1, numai că etapa inițială, de hidrofobizare a turbei prin încălzire în câmp de microunde, nu se mai realizează. Acizii humici extrași prin cele două procedee, cu sau fără microunde, au fost analizați din punct de vedere al indicelui de hidrofobicitate prin tehnica DRIFT (diffuse reflectance infrared Fourier transform, spectro- 45 47

RO 132516 B1

scopie IR cu transformată Fourier și difuzia reflectanței). Pentru analiza DRIFT probele de acizi humici (300 mg) au fost amestecate cu 900 mg KBr (FTIR grade 99%, Sigma-Aldrich, St.Louis, SUA) și mojarate. Amestecul mojarat a fost transferat într-o cupă cu reflectantă (diametru 12 mm). Spectrele DRIFT au fost măsurate pe un echipament Thermo Nicolet Avatar 320 FTIR (Thermo Fisher, Waltham, SUA), echipat cu accesorii „smart” pentru detectarea reflectanței difuze. Indicele de hidrofobicitate a fost estimat prin divizarea ariei pentru banda de absorbție alifatică (de la 3000...2800 cm⁻¹) la conținutul de carbon al probelor (Capriel, 1997, European Journal of Soil Sciences, 48, 457-462).

În produsele finale realizate a fost determinată activitatea analogului sintetic de strigolactone în inducerea modificărilor în tiparul de dezvoltare al ciupercilor patogene, respectiv Botrytis cinerea (Dor et al. 2011, Planta, 234, 419-427). S-a lucrat prin tehnica diluțiilor seriale 1 cu 1, determinându-se diluția maximă la care se mai observă efectul biologic. În tabelul 1 sunt prezentate rezultatele.

Indicele de hidrofobicitate al acizilor humici extrași din turbă tratată și netratată cu microunde și diluția maximă la care se mai observă efectul biologic al analogului de strigolactone GR24

Tabelul 1

| Variantă | Indice de hidrofobicitate | Diluția maximă la care se observă efect biologic |
|--|---------------------------|--|
| Exemplul 1, turbă tratată cu microunde | 23 | 1:1024 |
| Exemplul 2, turbă netratată cu microunde | 49 | 1:256 |

Rezultatele din tabelul 1 demonstrează faptul că prin tratare cu microunde se produce o hidrofobizare a acizilor humici, care permite o încărcare mai ridicată cu exo-semnale hidrofobe, respectiv cu analog de strigolactone GR24.

Exemplul 3

Compoziția formulată cu acizi humici și analog de strigolactone GR24 a fost menținută la temperatura camerei timp de 12 luni. Trimestrial s-a determinat diluția minimă la care se mai induc modificări în tiparul de dezvoltare al ciupercilor patogene, respectiv Botrytis cinerea (Dor et al. 2011, Planta, 234, 419-427). Nu au fost constatate modificări, deci analogul de strigolactone GR24 este stabil timp de 12 luni prin formulare în acizi humici.

Exemplul 4

Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește N-Tetradecanoil-DL-homoserin lactonă, un factor semnal utilizat de bacterii pentru detectarea cvorumului/densității populaționale și care este perceput de plante ca un semnal al prezenței microorganismelor, care activează răspunsul de apărare.

Exemplul 5

Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește naringenină, (±)-2,3-Dihidro-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-one, 4',5,7-trihidro-xiflavanone, izoflavonă care stimulează formarea simbiozelor fixatoare de azot la leguminoase.

Exemplul 6

Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește sorgoleone 364, 2-Hidroxi-5-metoxi-3-tridecil-[1,4]benzochinonă, compus cu acțiune alelopată și de inhibare a nitrificării.

RO 132516 B1

| | |
|---|---|
| Exemplul 7 | 1 |
| Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă, un analog sintetic de strigolactone. | 3 |
| Exemplul 8 | 5 |
| Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, un analog sintetic de strigolactone. | 7 |
| Exemplul 9 | 9 |
| Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește acid dihidroxistearic, un analog al monomerilor de cutină. | |

RO 132516 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de formulare a bio-moleculilor hidrofobe, care sunt exo-semnale cu rol de comunicare pentru reglarea interacțiilor tripărtite din rizosferă, **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit din următoarele etape: humificarea suplimentară și hidrofobizarea turbei oligotrofe, adusă la 25% umiditate, prin tratare în câmp de microunde prin încălzire timp de 20 min, de la 400...500 W, la temperaturi de maximum 92°C; amestecarea timp de 12 h a 1 parte de turbă oligotrofă hidrofobizată cu 5 părți într-o soluție de KOH 0,5M, la 35°C pentru extracția acizilor humici și fulvici; precipitarea acizilor humici prin aducerea pH-ului soluției la pH 2,5 cu acid fosforic 85% și recuperarea acizilor humici prin filtrare; resuspendarea acizilor humici în tampon citrat de sodiu-acid citric 0,1 M, în raport de 1 parte acid citric la 4 părți tampon, și adăugarea compuși hidrofobi, în raport de 0,02...1 la 100 părți acid humic; omogenizarea amestecului de acizi humici, prin trecerea repetată de 3 ori, printr-un microfluidizator cu camere ceramice, la o rată de 15 ml/min și la presiune de 140...150 Mpa.

5

7

9

11

13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 433/2020