



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 01014**

(22) Data de depozit: **03/12/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(71) Solicitant:
• **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;**
• **CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE OBȚINUT DIN EXSUDATE
RADICULARE ACUMULATE ÎN MEDIILE HIDROPONICE
RECIRCULATE**

(57) Rezumat:

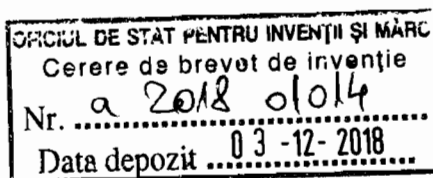
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biostimulant pentru plante cu rol de modulare a răspunsului plantelor la stres. Procedeu, conform invenției, constă în recuperarea selectivă a componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal din exsudate radiculare din medii hidroponice recirculate

prin ultrafiltrare tangențială amplificată micelar, în prezență de structuri amfifile neionice cu rol de formulare a componentelor bioactive hidrofobe recuperate.

Revendicări: 8

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).





BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE OBTINUT DIN EXSUDATE RADICULARE ACUMULATE ÎN MEDIILE HIDROPONICE RECIRCULATE

Prezenta invenție se referă la un biostimulant pentru plante cu rol de modulare a răspunsului plantelor la stres, obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate.

Sunt cunoscute diferite compoziții care sunt realizate pe baza exsudatele radiculare ale plantelor cultivate în hidroponie și/sau pe baza unor componente bioactive ale acestora. Aceste componente bioactive din exsudate radiculare au diferite proprietăți, fiind anti-microbiene, anti-inflamatoare, anti-oxidante, analgezice / anti-nociceptive, cu rol de accelerare a vindecării rănilor (Licá et al. 2018, *Food Research International*, **105**, 1039-1053) sau cu rol de exo-semnale (semio-chimicale), implicate în dialogul molecular al partenerilor specifici interacțiilor din rizosferă, plante de cultură (rădăcini) – (micro)organisme benefice – (micro)organisme dăunătoare (Sasse et al. 2018, *Trends in Plant Science*, **23**, 25-41; Venturi și Keel, 2016. *Trends in Plant Science*, **21**, 187-198).

Brevetul US6615537 B2 se referă la un procedeu de modificare a creșterii rădăcinilor plantelor care poate fi, de asemenea, utilizat pentru a colecta materialele extrase din rădăcinile plantelor prin creșterea rădăcinilor plantelor într-un mediu de creștere care este înconjurat de o membrană. Membrana este o membrană hidrofiliă fără pori, prin care apa este eliberată prin pervaporare, sau o membrană poroasă hidrofobă, prin care apa trece prin pori. Procedeu permite reținerea exsudatelor radiculare sub formă concentrată, dar aceste exsudate radiculare necesită prelucrări ulterioare pentru a utiliza componentele bioactive. Brevetul nu revendică produse care să se obțină pe baza exsudatelor radiculare astfel obținute.

Cererea de brevet WO2007088024 A1 descrie un procedeu de obținere a cel puțin unui compus glucozinolat dintr-un exsudat radicular al plantelor din ordinul *Capparales*, destinat utilizării ca materie primă pentru alimentele funcționale sau farmaceutice, care cuprinde următoarele etape: (a) planta este cultivată într-un sistem fără substrat solid; (b) este furnizată o soluție nutritivă cu un conținut ridicat de azot; (c) formarea de glucozinolat este stimulată prin administrarea a cel puțin unui elicitor; (d) glucozinolatul este obținut din exsudatul rădăcinii plantei. Dezavantajul acestui procedeu

este dat de faptul că implică cultivarea plantelor numai cu scopul major al producerii de exsudate. Procedul implică o serie de etape prin care este stimulată producerea de exsudate (soluții nutritive cu un conținut ridicat de azot), activarea metabolismului secundar și a formării de glucozinoizi, care nu sunt compatibile cu plantele care sunt cultivate pentru a fi recoltate și consumate în stare proaspătă – cum este de exemplu mediul cu un conținut ridicat de azot, care poate duce la acumularea de nitriți / nitrați în legumele astfel cultivate (de exemplu broccoli sau kale, plante din ordinul *Capparales*, care sunt cultivate în hidroponie în primele stadii de vegetație, ca super-alimente).

Procedul descris nu se poate aplica recuperării ingredientelor bio-active din mediile de cultură ale serelor comerciale cu sisteme hidroponice închise, destinate producerii de legume proaspete pentru consum. Astfel de sisteme hidroponice închise, care au o eficiență ridicată de utilizare a apei și a nutrienților, necesită oricum sisteme speciale de tratare a exsudatelor, pentru a evita o serie de fenomene negative, cum sunt cele de autotoxicitate sau de stimulare a agenților fitopatogeni (Hosseinzadeh *et al.* 2017, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **16**, 59-79). Recuperarea componentelor benefice din exsudatele plantelor dispersate în mediile hidroponice ar valorifica o resursă neglijată până în prezent și ar crește profitabilitatea serelor hidroponice cu mediu recirculat. Utilizarea acestor componente benefice ca ingrediente active pentru noi bioproduse folosite ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor ar deschide noi perspective de dezvoltare a domeniului.

Cererea de brevet CN108444766 A prezintă o instalație de tratare a mediilor de cultură hidroponice ale plantelor, care include o coloană umplută cu rășină schimbătoare de ioni XAD-4 destinată reținerii componentelor organice și un strat de nisip destinat reținerii mucilagiilor produse de rădăcinile plantelor. Rășina neutră XAD-4 reține din exsudatele radiculare, preponderent, componentele hidrofiele, zaharide, acizi organici și/sau aminoacizi (Li *et al.* 2015, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **178**, 963-975). Acizii organici sunt implicați atât în autotoxicitatea soluțiilor hidroponice reciclate, cât și în stimularea agenților fitopatogeni (Hosseinzadeh *et al.* 2017, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **16**, 59-79), iar înlăturarea lor este benefică pentru sistemele hidroponice în sistem închis. Instalația propusă și procedul aferent de operare nu permite însă concentrarea selectivă a componentelor bioactive

hidrofobe cu rol de exo-semnale din exsudatele radiculare, implicate în dialogul molecular dintre rădăcinile plantelor și (micro)organismele din rizosferă.

Aceste componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal sunt deosebit de importante pentru dezvoltarea plantelor de cultură. Componentele bioactive cu rol de exo-semnal sunt semio-chimicale, compuși chimici care transmit informații în rizosferă, adică în acel spațiu delimitat de rădăcinile plantelor, care reprezintă un habitat preferat pentru (micro)organismele asociate plantelor (Zhang, et al 2015. *Current Opinion in Biotechnology*, **32**, 136-142). Aceste semiochimicale, denumite și info-chimicale, sunt de mai multe categorii, de interes pentru rizosferă fiind kairomonii, semnalele chimice care sunt benefice pentru organismul receptor și dăunătoare pentru organismul emițător, și sinomoni, semnale chimice benefice atât pentru organismul emițător, cât și pentru cel receptor (Dicke și Sabelis, 1988, *Functional Ecology*, **2**, 131-139).

De exemplu, simbiozele fixatoare de azot, importante pentru cultivarea sustenabilă a plantelor leguminoase, care furnizează proteine lanțului alimentar și azot fixat solului (Jensen et al. 2012. *Agronomy for Sustainable Development*, **32**, 329-364), implică un dialog între rădăcinile plantelor și rhizobii, mediat de către flavonoide hidrofobe (produse de rădăcinile plantelor) și de factorul **Nod** mitogen specific, de natură lipochitooligozaharidică, produs de rhizobii (Cooper, 2007, *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 1355-1365). Ciupercile de micoriză, esențiale pentru mobilizarea fosforului și a micro-elementelor din sol, produc și ele un factor mitogen lipochitooligozaharidic, cu structură asemănătoare factorului Nod, denumit factor **Myc** (Maillet et al. 2011, *Nature*, **469**, 58-63). Activitatea biologică a semiochimicelor / infochimicelor de tipul sinomoni este definită la acești compuși amfifili de porțiunea hidrofobă, pentru care s-au identificat kinaze specifice cu funcțiune similară receptorilor (Malkov et al. 2016, *Biochemical Journal*, **473**, 1369-1378). Un alt exemplu de componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal este cel al strigolactonelor, un grup de derivați carotenoidici / lactone sequisterpenice puternic hidrofobe, produse de rădăcinile plantelor, care stimulează germinarea sporilor ciupercilor de micoriză, cu ramificarea hifelor (Akiyama et al. 2005, *Nature*, **435**, 824-827), modifică tiparul 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 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, inducând germinarea semințelor respectivelor plante parazite, la momentul oportun parazitării (Matusova et al. 2005, *Plant Physiology*, **139**, 920-934). Strigolactonele au deci atât un rol de sinomon, fiind benefice pentru plantele emițătoare și pentru organismele receptor, cât și un rol de kairomon, dăunător pentru plantele emițătoare și benefic pentru organismele receptor (Lopez-Raez et al. 2017, *Trends in Plant Science*, **22**, 527-537).

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 timp și în stimularea dezvoltării apresorilor oomicetelor fitopatogene (Wang et al. 2012, *Current Biology*, **22**, 2242-2246). Și acești monomeri de cutină au un rol dublu, de sinomon și de kairomon. Sorgoleonele, componentul major al exsudatelor hidrofobe ale plantelor de sorg, sunt un exemplu tipic de alomoni, acționând atât ca inhibitori ai proceselor de nitrificare din sol, crescând eficiența utilizării azotului (Subbarao et al. 2013, *Plant and Soil*, **366**, 243-259), cât și ca semnale implicate în interacțiile alelopatice dintre plante, cu un efect erbicid / toxic pentru alte plante (Einhellig și Souza, 1992, *Journal of Chemical Ecology*, **18**, 1-11).

Plantele secretă compuși care mimează N-acil-homoserin-lactonele bacteriene (Teplitski et al. 2000, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 637-648), componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal implicate în comunicarea din cadrul comunităților microbiene și în reglarea concertată a exprimării genelor / *quorum sensing* (Fuqua et al. 2001, *Annual Review of Genetics*, **35**, 439-468). Percepția de către plante a N-acil-homoserin-lactonele, ca un indicator al prezenței microorganismelor / un tipar molecular asociat microbilor (MAMP, *microbe-associated molecular pattern*), determină o serie de efecte benefice, inclusiv amorsarea sistemului de apărare din plante (Schikora et al. 2016, *Plant Molecular Biology*, **90**, 605-612).

Astfel de componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal, care favorizează răspunsul microorganismelor benefice plantelor, sunt utile pentru a realiza noua generație de biostimulanți pentru plante, caracterizată prin sinergismul componentelor (Rouphael și Colla, 2018, *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1655). Biostimulanții pentru plante sunt o nouă clasă de produse utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care determină: creșterea eficienței de preluare și utilizare a nutrienților de

către plante, mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici și îmbunătățirea calității recoltei (du Jardin, 2015. *Scientia Horticulturae*, **196**, 3-14). Interesul crescut pentru biostimulanți este determinat de faptul că această nouă clasă de inputuri agricole asigură o intensificare sustenabilă a producțiilor agricole în condițiile schimbărilor climatice (Calvo et al. 2014, *Plant and Soil*, **383**, 3-41). Biostimulanții pentru plante sunt clasificați în două mari categorii: microbieni (ca de exemplu inoculanți - *Azotobacter* spp., ciuperci de micoriză, *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) și non-microbieni, organici („conținând carbon numai de origine animală sau vegetală”) și anorganici - în special elemente benefice, ca de exemplu siliciu solubil / acidul silicic (COM (2016) 157, propunere de Regulament referitor la fertilizantii EC). Componentele bioactive cu rol de exo-semnale implicate în dialogul molecular de la nivelul rizosferei, dintre rădăcinile plantelor și microorganismele benefice sau dăunătoare, reprezintă o clasă integrativă, de biostimulanți non-microbieni, organici, care favorizează răspunsul microorganismelor benefice plantelor, cum sunt de exemplu ciupercile de micoriză – incluse în clasa biostimulanților microbieni.

Au fost deja prezentate diferite compoziții de biostimulanți pentru plante care includ componente bioactive cu rol de exo-semnale din rizosferă, fie ca atare, deci din clasa biostimulanților non-microbieni, fie împreună cu microorganismele benefice din rizosferă, considerate biostimulanți microbieni. În cele ce urmează se prezintă o scurtă enumerare, care nu este exhaustivă, cu scopul de a exemplifica potențialul aplicativ al componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal din rizosferă. Lipo-chito-oligozaharidele (LCO) au fost revendicate ca ingrediente care stimulează plantele, singure (brevet EP2358194 B1, factor Myc) sau în combinație cu biostimulanți microbieni - *Bacillus amyloliquefaciens*, în special tulpina SB3281, atât cu LCO factor Nod, cât și cu LCO factor Myc (cerere de brevet WO2017205258 A1); tulpini de *Penicillium bilaiae* care solubilizează fosforul, NRRL 50162, NRRL 50169, ATCC 20851, ATCC 22348 și/sau ATCC 18309 (cererea de brevet EP2748123 A1); tulpina GI-320 de *Trichoderma virens* (cererea de brevet US 20180235219 A1); tulpini benefice / biostimulante de *Streptomyces*, *Trichoderma* sau *Bacillus*, opțional și pesticide, pentru tratament la sămânță (cererea de brevet US 20170223956 A1). Brevetul US 8101171 B2 se referă la utilizarea strigolactonelor naturale, strigol, alectrol, sorgolactone, orobanchol, sau a analogilor lor sintetici GR7, GR24, Nijmegen1, dimetilsorgolactone,

pentru intensificarea interacției simbiotice dintre ciupercile producătoare de endomycorize (AM) și plantele cultivate. Brevetul dezvăluie 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.

Au fost propuse compoziții pe bază de analogi sau mimetici de strigolactone pentru a crește toleranța plantelor la stres. Așa cum s-a menționat deja, strigolactonele sunt printre cele mai reprezentative componente bioactive cu rol de exo-semnal. Strigolactonele au fost extrase din soluții hidroponice pe care au fost cultivate plante uzual utilizate pentru culturi hidroponice pe scară largă, tomate și salată (Yoneyama et al. 2012, *Planta*, 235, 1197-1207). Efectul lor în creșterea toleranței la stres este datorat funcției lor duble, atât de endo-semnal, respectiv de fitohormon implicat în adaptarea plantelor la stres (Mostofa et al. 2018, *Plant, Cell & Environment*, 41, 2227-2243), cât și de exo-semnal, respectiv în reglarea interacției dintre plante și microorganismele benefice (Lanfranco et al. 2017, *Journal of Experimental Botany*, 69, 2175-2188). Cererea de brevet US2018220650 (A1) descrie un analog de strigolactone pe bază de butenolid disubstituit care este mai eficient în limitarea efectelor stresului hidric la porumb față de analogul de strigolactone AB01, butenolid monosubstituit, revendicat prin brevetul US9994557 B2. Cererea de brevet RO131928 A2 prezintă utilizarea analogilor de strigolactone, cu structură de 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă și 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, pentru a amplifica răspunsul microorganismelor benefice plantelor, respectiv: solubilizarea fosforului; producerea de siderofori; biosinteza de compuși cu efect de stimulare a creșterii plantelor; eliberarea de poliamine și siliciu cu rol de creștere a rezistenței la stresurile abiotice. Cererea de brevet RO RO132514 A2 se referă la compuși de sinteză, mimetici ai strigolactonelor, care conțin în structură un ciclu aromatic sau heteroaromatic legat de un ciclu de furan-2-onă printr-un atom de oxigen sau o grupă NH și care determină efecte specifice de biostimulant pentru plantele de porumb și floarea-soarelui cultivate în sistem

conservativ, respectiv: creșterea eficienței de utilizare a azotului, amplificarea toleranței la factorii de stres abiotici; îmbunătățirea calității recoltei.

Un dezavantaj al acestor compoziții pe bază de compuși sintetici este imposibilitatea lor de înregistrare ca biostimulanți pentru plante. Biostimulanții pentru plante sunt o categorie de produse destinate utilizării ca inputuri în tehnologiile de cultură ale plantelor care trebuie să conțină *carbon numai de origine animală sau vegetală* - COM (2016) 157, propunere de Regulament referitor la fertilizantii EC. Această înseamnă că aceste produse de sinteză chimică, care au o acceptanță publică redusă, trebuie să îndeplinească proceduri îndelungate și costisitoare pentru a dovedi siguranța și eficacitatea înainte de a fi omologate în vederea punerii pe piață (Vurro et al. 2016, *Pest Management Science*, **72**, 2026-2034).

O soluție care ar permite omologarea unor produse care să includă și strigolactone naturale / care conțin carbon de origine vegetală, este recuperarea acestora din mediile hidroponice, împreună cu alte componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal. În mediile hidroponice, aceste componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal sunt de obicei dispersate la limita de solubilitate, de unde sunt recuperate în cantități foarte mici prin extracție cu solvenți organici (Xie et al. 2019, 157, 200-205). Extracția cu solvenți organici nu este o soluție compatibilă cu recircularea mediilor hidroponice – cantitățile de solvenți necesare ar fi foarte mari, instalațiile pentru ridicare la scară ar fi de asemenea prea mari și practic incompatibile cu serele care cultivă plante pe medii hidroponice recirculate, urmele de solvenți organici au potențial fitotoxic, solvenții organici au riscuri semnificative – de incendiu, de securitatea muncii, de mediu.

Brevetul US9241454 B2 descrie un produs pe baza factorilor **Myc**, amestec de lipo-chito-oligozaharide sulfatate și nesulfatate (LCOs), și un procedeu de obținere în care sunt utilizate și rădăcinile micorizate. Procedeu implică extracția exsudatelor cu butanol, recuperarea extractului de butanol conținând lipo-chito-oligozaharidele, extracția în fază solidă pe o fază inversă C18, cu spălări succesive la acetonitril 20%, 50% și 100% și recuperarea fracției eluate la 50% acetonitril conținând factorii Myc. În exemplificarea de preferat, procedeu cuprinde etape ulterioare de supunere a fracției eluate la acetonitril 50%, pe cromatografie lichidă de înaltă performanță pe o coloană cu fază inversă C18, utilizând un gradient liniar de 20% până la 100% acetonitril, cu

recuperarea fracției eluate la 30-48% acetonitril, care conține lipo-chito-oligozaharide sulfatate și / sau fracția eluată la 64-72% acetonitril, care conține lipo-chito-oligozaharide nesulfate. Procedeu descris în brevetul US 9241454 B2 utilizează solvenți organici și prezintă același dezavantaj, deja descris, de ne-adaptare ca procedeu pentru recuperarea componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal din mediile hidroponice recirculate.

Un procedeu eficient pentru recuperarea compușilor hidrofobi foarte diluați în medii apoase este cel al ultrafiltrării amplificate prin micelare, *Micellar enhanced ultrafiltration* – MEUF (Schwarze, 2017. *Environmental Science: Water Research & Technology*, **3**, 598-624). Prin acest procedeu compușii hidrofobi diluați în medii apoase sunt incluși în miclele formate de surfactanți amfifili (*extracție micelară*), iar miclele rezultate sunt separate de mediul apos prin ultrafiltrare. Procedee de ultrafiltrare amplificată prin micelare au fost descrise pentru decontaminarea apelor de poluanți hidrofobi (brevet KR100788848 B1, în care se folosesc nanoparticule amfifile de poli-acrilat de uretan) sau pentru eliminarea fenolilor din apele industriale sau din apele freatiche contaminate – Brevet US8002988 B2, care utilizează surfactanți pe bază de zaharuri, respectiv n-dodecil- β -D-maltozidă. Nu au fost descrise însă procedee de ultrafiltrare amplificată prin micelare prin care să se recupereze componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal din rizosferă, din mediile hidroponice recirculate.

Procedeele uzuale de ultrafiltrare amplificată prin micelare sunt utilizate și pentru purificarea de metale grele (de ex. Cu, Li et al. 2006. *Chemosphere*, **63**, 353-358), care se leagă de partea hidrofilă a surfactanților anionici. În soluțiile hidroponice o serie de astfel de metale grele, ca de ex. Zn sau Cu, sunt micro-elemente esențiale pentru realizarea ciclului de dezvoltare a plantelor (Hänsch și Mendel 2009. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 259-266), deci înlăturarea acestor ioni ar afecta semnificativ calitatea mediilor hidroponice recoltate. De asemenea calitatea mediilor hidroponice reciclate ar fi afectată și de surfactanți care nu sunt incluși în miclele și care ar putea trece prin membrana de ultrafiltrare. Este deci necesar ca procedeu de ultrafiltrare amplificată prin micelare pentru recuperarea componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal din rizosferă să nu afecteze calitatea mediilor hidroponice.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a obține un biostimulant pentru plante din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate printr-un procedeu care să nu afecteze calitatea mediilor hidroponice.

Biostimulantul pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate ale unor legume de seră are un conținut de 0,25% surfactanți non-ionici și componente bioactive hidrofobe, recuperate selectiv din exsudatele radiculare pe baza unui procedeu de ultrafiltrare tangențială amplificată micelar, în care structurile amfifile neionice folosite au și rol de formulare a componentelor bioactive hidrofobe recuperate.

Legumele de seră cultivate hidroponic sunt roșii, castraveți, ardei, salată.

Procedeul de ultrafiltrare pentru recuperarea selectivă a componentelor bioactive din mediul hidroponic supus procedurii se realizează prin adăugarea structurii amfifile neionice într-o cantitate eficientă pentru atingerea concentrației critice micelare, de preferință în proporție de 0,1% - 0,5% din masa de mediu hidroponic recirculat, ajustarea pH-ului suspensiei la valori de 5,6 – 6,2 și agitarea suspensiei un timp suficient pentru formarea micelilor, în general timp de minim 15 minute, la temperatura camerei, ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, pe o membrană cu limită de excludere de 5 - 100 KDa, la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul util al vasului de alimentare, și la o diferență de presiune de 140-170 kPa.

Retentatul se concentrează până la 5% de masă substanță uscată și se sterilizează prin ultrafiltrare pe membrană de 0,2 μm pentru formularea în vederea utilizării ca biostimulant pentru plante.

Structurile purtător amfifile sunt structuri non-ionice și cu polaritate limitată: eter alchilic de polioxietilen; tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, nanoparticule de seleniu cu o coroană de expansine microbiene, sau combinații ale acestora.

Eterul alchilic de polioxietilen preferat, care are o capacitate mare de legare a componentelor bio-active hidrofobe prezente uzual în mediile hidroponice recirculate este eterul etilic de polioxietilen (20), cu o masă moleculară de 1149 daltoni, și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 15,3.

Tribloc co-polimerul preferat ca structură amfifilă care are o capacitate mare de legare a componentelor bio-active hidrofobe prezente uzual în mediile hidroponice

recirculate este un compus care are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22.

Nanoparticulele biogene de seleniu preferate, cu o coroană de expansine microbiene care au o capacitate mare de legare a componentelor bio-active hidrofobe prezente uzual în mediile hidroponice recirculate sunt biosintetizate de fungi producători de proteine amfifile de tipul expansinelor microbiene, cerato-platanine sau swollenine, și au dimensiuni cuprinse între 75 -120 nm, și un potențial zeta de $-35 \pm 7,2$ mV.

pH-ul se ajustează prin adăugarea unui compus adecvat, la îndemâna specialistului. În general, ajustarea pH-ului este în direcția acidifierii mediului.

Permeatul rezultat din ultrafiltrarea tangențială este prelucrat apoi conform procedeelelor cunoscute (Hosseinzadeh *et al.* 2017, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **16**, 59-79), pentru a se realiza detoxifierea și eliminarea compușilor care ar favoriza dezvoltarea microorganismelor fitopatogene, ca și a eventualelor molecule de surfactanți care ar fi trecut prin membrana de ultrafiltrare, și recirculat în mediul hidroponic.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Se integrează în tehnologia de cultivare a plantelor pe medii hidroponice recirculate;
- ✓ Asigură o recuperare selectivă a componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal în rizosfera plantelor, cu o contaminare redusă cu compuși hidrofilii responsabili pentru fenomene negative în mediile de cultură hidroponice;
- ✓ Este ușor de ridicat la scară, pentru că implică utilizarea unor echipamente care sunt disponibile pentru procesarea diferitelor volume de lichid;
- ✓ Nu interferă cu procesele de eliminare a componentelor hidrofobe, în general acizi organici, implicate în fenomenele de autotoxicitate și stimulare a agenților fitopatogeni;
- ✓ Nu modifică calitatea și nu contaminează mediile de cultură hidroponice reciclate cu produși care să afecteze productivitatea plantelor cultivate pe aceste sisteme;
- ✓ Introduce o nouă categorie de produse utilizabile pentru separarea prin ultrafiltrare amplificată prin micelare, respectiv nanoparticule hidrofobe de seleniu zero-valent, formate prin biosinteză de către fungii care secretă cantități importante de proteine amfifile de tip expansine microbiene, al căror rol de elicitor al răspunsului de apărare din plante, este complementar componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-

semnale (a se vedea de ex., pentru cerato-platanine, lucrarea Pazzagli, et al. 2014, *Plant Science*, **228**, 79-87;

✓ Formularea componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal ca includeri în interiorul unor micide asigură un acces redus al apei și crește stabilitatea acestora, menținând activitatea lor biologică pe o perioadă de timp mai mare.

In continuare se prezintă exemple de realizare a invenției.

Exemplu 1. Pe un sistem de cultivare hidroponică Wilma XXL (Atami, Rosmalen, Olanda), prevăzut cu 20 de ghivece de 6 litri, și cu un rezervor de 100 litri utili pentru mediu de cultură, se cultivă roșii în sistem hidroponic. Pe furtunurile care conectează rezervorul de nutrienți în soluție cu ghivecele hidroponice se intercalează un sistem de ultrafiltrare tangențială, alcătuit din 1 recipient de 8 litri (5 litri utili), prevăzut cu agitator mecanic, care este vasul de alimentare, 1 modul de ultrafiltrare Biomax, cu membrană de polietersulfonă, cu pragul de excludere de 5 kDa și cu o suprafață de 50 cm² (Merck Group, Darmstad, Germania), 1 recipient de recepție a retentatului de 1 litru util, 1 recipient de recepție a permeatului și un sistem de pompe pentru ultrafiltrare Cogent M1 (Merck Group). Recipientele se conectează prin furtune de plastic cu modulul Biomax. Printr-o valvă distribuitor prevăzută cu reometru recipientul de alimentare al sistemului de ultrafiltrare se conectează cu rezervorul sistemului Wilma XXL. Sistemul de pompe Cogent M1 se conectează prin furtune de plastic cu modulele Biomax. Recipientul de recepție a permeatului se conectează printr-o valvă la o pompă peristaltică Masterflex L/S (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, SUA), cu un debit maxim de 280 mL/min. Pompa peristaltică alimentează o coloană cromatografică cu dimensiunile de 5 x 30 cm, împachetată cu rășină neutră Amberlite[®] XAD4 (Dow DuPont, Midland, MI, SUA), de 20-60 mesh, destinată reținerii componentelor nedorite din exsudatele radiculare, inclusiv eventualele particule de surfactant neintegrate în micide și care ar putea trece de membrana de ultrafiltrare.

Se preiau din rezervorul sistemului Wilma XXL 5 litri. În acești 5 litri se introduc 5 g de eter etilic de polioxietilen (20) (Brij[®] 98, Croda International, Snaith, Marea Britanie). Se ajustează pH la valoare de 5,6 cu o soluție 0,01 N HNO₃ și se agită timp de 15 min, la temperatura camerei, pentru a facilita captarea componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal în interiorul micidei formate de eterul etilic de

polioxietilen. Se procedează la ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, prin ultrafiltrare pe o membrană cu limită de excludere de 5 KDa, la un debit de 50 mL/min, cu o diferență de presiune de 140 kPa. Permeatul se reia cu pompa peristaltică și se introduce pe coloană cromatografică. Retentatul se concentrează până la 7% substanță uscată (verificată refractometric, cu refractometru digital HI 96801, Hanna Instruments, Cluj Napoca, România), prin concentrare la un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300, Buchi, Flavil, Elveția). Rezultă circa 5 ml de concentrat care se sterilizează prin ultrafiltrare pe membrană de 0,2 μm. Cei 5 ml de retentat concentrat cu componente bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal se amestecă cu 245 ml de soluție 5% de alcool polivinilic (Emprove® 4-88, Merck), în vederea utilizării ca biostimulant pentru plante.

În produsul rezultat este determinată activitatea biologică a componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal, ca inducere a: creșterii sporilor ciupercilor de micoriză (Nagahashi și Douds, 1999. *Biotechnology Techniques*, **13**, 893-897), germinării semințelor de plante parazite și modificărilor în tiparul de dezvoltare al ciupercilor patogene, respectiv *Fusarium graminearum* DSM 4527 (Oancea et al. 2017, *Molecules*, **22**, 961). Se lucrează prin tehnica diluțiilor seriale 1 cu 1, determinându-se diluția maximă la care se mai observă efectul biologic. Nu se mai observă activitate biologică după diluții de 1:256 la inducerea germinării sporilor de *Gigaspora margarita* și a semințelor de *Orobanche cumana* și de 1:8 în inducerea tiparului de dezvoltare al ciupercilor patogene.

Exemplu 2. Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Plantele sunt de ardei. Purtătorul amfifil utilizat este un tribloc co-polimerul, cu o masă moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22, fiind cunoscut sub denumirea comercială de Pluronic® F127 (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania), aplicat în concentrație de 0,5%. pH-ul se ajustează la valoarea 6.0, iar această valoare nu determină modificări semnificative ale caracteristicilor de calitate ale mediului hidroponic recirculat. Membrana de ultrafiltrare are limita de excludere de 30 KDa, iar diferența de presiune este 170 kPa.

În produsul rezultat este determinată activitatea biologică a componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal, ca inducere a: creșterii sporilor ciupercilor de micoriză (Nagahashi și Douds, 1999. *Biotechnology Techniques*, **13**, 893-897),

germinării semințelor de plante parazite și modificărilor în tiparul de dezvoltare al ciupercilor patogene, respectiv *Fusarium graminearum* DSM 4527 (Oancea et al. 2017, *Molecules*, **22**, 961). Se lucrează prin tehnica diluțiilor seriale 1 cu 1, determinându-se diluția maximă la care se mai observă efectul biologic. Nu se mai observă activitate biologică după diluții de 1:512 la inducerea creșterii sporilor de *Gigaspora margarita*, de 1:256 la inducerea germinării semințelor de *Orobanche cumana* și de 1:8 în inducerea tiparului de dezvoltare al ciupercilor patogene *F. graminearum*.

Exemplu 3. Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Plantele sunt de castraveți. Purtătorul amfifil utilizat este reprezentat de nanoparticulele biogene de seleniu cu o coroană de expansine microbiene, aplicate în concentrație de 0,3%. pH-ul se ajustează la valoarea 6.0, iar această valoare nu determină modificări semnificative ale caracteristicilor de calitate ale mediului hidroponic recirculat. Membrana de ultrafiltrare are limita de excludere de 100 KDa, iar diferența de presiune este 150 kPa. Nanoparticulele biogene de seleniu cu o coroană de expansine microbiene sunt biosintetizate de fungi producători de proteine amfifile de tipul expansinelor microbiene, cerato-platanine sau swolenine.

Exemple de fungi care sintetizează nanoparticulele de seleniu cu coroană de expansine sunt: *Trichoderma harzianum* Td50b, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) F 001412 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, Ungaria, producătoare de cerato-platanine; tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b, depozitată sub numărul P(F) 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) Budapesta, producătoare de swolenine; tulpina *Trichoderma* spp. T27, care este producătoare de expansine microbiene. Tulpinile se cultivă pe mediu cartof-glucoză, cu adaos de 1mM de selenit de sodiu. Se incubă timp de 5 zile, la temperatura de 28°C, pe agitator rotativ la 70 rpm. După 5 zile se separă nanoparticulele rezultate, la o forță centrifugală relativă de 2500 x g. Dimensiunile nanoparticulele formate sunt cuprinse între 75 -120 nm, iar potențialul zeta este de $-35 \pm 7,2$ mV.

În produsul rezultat este determinată activitatea biologică a componentelor bioactive hidrofobe cu rol de exo-semnal, ca inducere a: creșterii sporilor ciupercilor de micoriză (Nagahashi și Douds, 1999. *Biotechnology Techniques*, **13**, 893-897), germinării semințelor de plante parazite și modificărilor în tiparul de dezvoltare al

ciupercilor patogene, respectiv *Fusarium graminearum* DSM 4527 (Oancea et al. 2017, *Molecules*, **22**, 961). Se lucrează prin tehnica diluțiilor seriale 1 cu 1, determinându-se diluția maximă la care se mai observă efectul biologic. Nu se mai observă activitate biologică după diluții de 1:512 la inducerea germinării sporilor de *Gigaspora margarita* și a semințelor de *Orobanche cumana* și de 1:16 în inducerea tiparului de dezvoltare al ciupercilor patogene.

Exemplu 4. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se lucrează cu un amestec molar de tribloc co-polimerul, cu o masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22 - eter etilic de polioxietilen (20), aplicat în concentrație de 0,3%.

Exemplu 5. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se lucrează cu plante de salată și un amestec de eter etilic de polioxietilen (20) și nanoparticule de seleniu, aplicat în concentrație de 0,1%, și respectiv, 0,3%.

Exemplu 6. Compozițiile realizate conform ex. 1 - 3 au fost testate în condiții de seră, pe plante de tomate. Plantele de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Menhir F1), răsaduri de 60 zile, au fost transplantate în vase de vegetație de 25 cm și 50 cm înălțime, în care s-au introdus câte 5 litri de substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV, Oosterhout, Olanda). Vasele de vegetație au fost menținute în condiții de seră, la $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul zilei și $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160\text{ mcE/m}^2/\text{s}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500\text{ mcE/m}^2/\text{s}$. Experimentul a durat 56 zile. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai o singură dată, după 28 zile de la transplantare, prin aplicarea a 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 (N-P₂O₅-K₂O, Euro fertil, TimacAgro Romania). Experimentul a fost organizat în bloc randomizat cu câte 4 repetiții pentru fiecare variantă, fiecare repetiție incluzând câte 5 plante. Variantele testate experimental au inclus și martori stropiți cu apă, stresat hidric și nestresat, și un produs de referință. Produsul de referință a fost obținut prin extragerea a 50 litri cultură hidroponică de roșii, cu acetat de etil, în conformitate cu metoda descrisă de (Xie, et al. 2019, *Phytochemistry*, 157, 200-205). Extractul în acetat de etil s-a evaporat la sec, reziduul a fost reluat în 5 ml de hexan, care a conținea 1% polisorbitat 20 (polioxietilen sorbitan

monolaurat, Tween 20). Soluția hexanică a fost emulsionată în alcool polivinilic 5%, în raport de 1 g la 49 grame. Înainte de aplicare produsele conform exemplu 1-3 și produsul de referință au fost diluate de 10 ori cu apă de stropit.

Variantele experimentale rezultate au fost:

V₁ – martor nestresat hidric, tratat cu apă; 2 tratamente x 10 ml per ghiveci, echivalent 500 l/ha;

V₂ – martor stresat hidric, tratat cu apă, 2 tratamente x 10 ml per ghiveci, echivalent 500 l/ha;

V₃ – nestresat hidric, tratat cu extract referință, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

V₄ – stresat hidric, tratat cu extract referință, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

V₅ – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

V₆ – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

V₇ – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.2, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

V₈ – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.2, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

V₉ – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex. 3, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

V₁₀ – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.3, 2 tratamente x 10 ml soluție 0,2% per plantă, echivalent 1 litri în 500 l/ha;

Tratamentele s-au aplicat în a 2-a și a 29-a zi după transplantare, prin stropirea solului din fiecare ghiveci cu ajutorul un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare, Somerset, PA, SUA). Martorul nestresat hidric a fost udă o dată la cinci zile la 100% capacitate de câmp, iar variantele stesate hidric au fost udăte la două săptămâni la 100% capacitate de câmp. La sfârșitul celor 8 săptămâni de la transplantare s-a desființat experiența, determinându-se parametri morfologici ai plantelor, respectiv înălțimea plantelor, lungimea rădăcinii, numărul de

frunze și suprafața frunzelor, ca și masa de fructe coapte per plantă. Datele s-au prelucrat prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. Compozițiile realizate conform invenției au evident efect de biostimulant pentru plante, ameliorând toleranța plantelor de tomate la stresul hidric.

Tab. 1. Influența tratamentelor cu compoziții realizate conform invenției asupra plantelor de tomate, stresate și nestresate hidric*.

VARIANTĂ EXPERIMENTALĂ	ÎNĂLȚIME PLANTE (cm)	LUNGIME RĂDĂCINI (cm)	NUMĂR FRUNZE	SUPRAFAȚĂ FRUNZE (mm ²)	PRODUCȚIE MEDIE** (g fructe coapte / plantă)
V1 – martor nestresat hidric, tratat cu apă	51,23±2,42b	54,27±1,24b	28,00±4,5b	642,73±18,45b	314±32,8b
V2 – martor stresat hidric, tratat cu apă	38,22±4,24c	34,63±5,45c	21,50±2c	507,05±22,82c	174±47,8c
V3 – nestresat hidric, tratat cu extract referință	53,46±3,94b	56,82±2,53b	27,50±4,5b	684,38±27,52b	327±42,6b
V4 – stresat hidric, tratat cu extract referință	40,22±5,48c	43,67±6,52c	22,50±1,5c	517,74±24,38c	182±52,7c
V5 – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1	57,56±1,92ab	53,52±3,84b	29,50±1,5b	649,21±32,97b	324±18,9b
V6 – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1	44,50±4,82b	42,94±2,28b	28,00±2,5b	527,61±32,42c	209±54,8bc
V7 – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex. 2	54,78±5,94b	52,84±3,92b	30,00±2,5b	624,82±12,75b	323±48,4b
V8 – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex. 2	43,24±4,96b	50,07±1,75b	30,5±3,5b	603,16±25,84bc	318±37,4b
V9 – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex. 3	62,52±3,49a	57,85±1,34a	34,50±3,5a	700,85±15,94a	383±34,8a
V10 – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex. 3	54,0±5,24b	54,60±3,27b	32,5±2,5ab	641,16±27,28b	327±29,5b

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P > 0,05$; **Producția pe 30 zile ciclu de înflorire - fructificare

Compozițiile conform ex. 1-3 au o activitate de biostimulant de creștere, determinând o reducere a efectelor produse de stresul hidric la plantele de tomate. Activitatea este superioară produsului obținut prin extracție chimică, utilizat ca referință, iar folosirea nanoparticulelor de seleniu are un evident efect sinergic. Seleniu îmbunătățește toleranța plantelor la stresul hidric (Ahmad et al. 2016. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 372-380), iar nanoparticulele de seleniu au un efect superior, datorită probabil eliberării lente a speciilor biologice active (El-Ramady et al. 2016. *Environmental Chemistry Letters*, 14, 123-147).

Revendicări

1. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform invenției, **caracterizat prin aceea că** se obține din mediile de cultură ale unor legume de seră cultivate hidroponic și are un conținut de 0,25% surfactanți non-ionici și componente bioactive hidrofobe, recuperate selectiv din exsudatele radiculare pe baza unui procedeu de ultrafiltrare tangențială amplificată micelar, în care structurile amfifile neionice folosite au și rol de formulare a componentelor bioactive hidrofobe recuperate.
2. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** legumele de seră cultivate hidroponic sunt roșii, castraveți, ardei, salată
3. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** procedeul de ultrafiltrare pentru recuperarea selectivă a componentelor bioactive din mediul hidroponic supus procedurii se realizează prin adăugarea structurii amfifile neionice într-o cantitate eficientă pentru atingerea concentrației critice micelare, de preferință în proporție de 0,1% - 0,7% din masa de mediu hidroponic recirculat, ajustarea pH-ului suspensiei la valori de 5,6 – 6,2 și agitarea suspensiei un timp suficient pentru formarea micelilor, în general timp de minim 15 minute, la temperatura camerei, ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, pe o membrană cu limită de excludere de 5 - 100 KDa, la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul util al vasului de alimentare, și la o diferență de presiune de 140-170 kPa,
4. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** retentat rezultat prin ultrafiltrare este concentrat până la 5% de masă substanță uscată și sterilizat prin ultrafiltrare pe membrană de 0,2 μm, pentru formulare în vederea utilizării ca biostimulant pentru plante.
5. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** structurile purtător amfifile sunt alese dintre eter alchilic de polioxietilen, tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de

polietilenglicol, nanoparticule de seleniu cu o coroană de expansine microbiene, sau combinații ale acestora.

6. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** structura purtător amfifilă de eter alchilic de polioxietilen preferată este eterul etilic de polioxietilen (20), cu o masă moleculară de 1149 daltoni, și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 15,3,

7. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** structura purtător amfifilă de tribloc co-polimerul preferată are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22.

8. Biostimulant pentru plante obținut din exsudatele radiculare acumulate în mediile hidroponice recirculate conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** structurile purtător amfifile de nanoparticulele biogene de seleniu cu o coroană de expansine microbiene preferate sunt biosintetizate de fungi producători de proteine amfifile de tipul expansinelor microbiene, cerato-platanine sau swollenine, care au dimensiuni cuprinse între 75 -120 nm, și un potențial zeta de $-35 \pm 7,2$ mV.