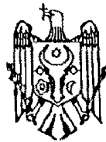




MD 4694 C1 2021.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4694** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A01N 63/20* (2020.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 27/00 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2019 0003 (22) Data depozit: 2019.01.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.05.31, BOPI nr. 5/2020
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: TROFIM Alina, MD; BULIMAGA Valentina, MD; BULIMAGA Maria-Bianca, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de obținere a stimulatorilor de creștere a plantelor din cianobacterii

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie și agricultură, în special la obținerea stimulatorilor de creștere a plantelor din cianobacterii pentru utilizare în agricultură și poate fi folosită la cultivarea gramineelor, plantelor aromatice, leguminoaselor.

Procedeul de obținere a stimulatorilor de creștere a plantelor din cianobacterii include cultivarea cianobacteriei *Nostoc halophilum* pe mediul Drew sau a cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul Zarrouk modificat, la

2
temperatura de 28°C și iluminarea de 2500-3500 lx, timp de 20 de zile, separarea biomasei de lichidul cultural prin filtrare, diluarea filtratului de 2-3 și, respectiv, de 10-15 ori.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea stimulatorilor de creștere a plantelor din *Nostoc halophilum* sau *Spirulina platensis* cu un conținut sport de gibereline.

Revendicări: 1

MD 4694 C1 2021.02.28

(54) Process for producing plant growth stimulants from cyanobacteria**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology and agriculture, in particular to the production of plant growth stimulants from cyanobacteria for use in agriculture and can be used in the cultivation of cereals, aromatic, leguminous plants.

The process for producing plant growth stimulants from cyanobacteria comprises cultivating *Nostoc halophilum* cyanobacteria on Drew medium or *Spirulina platensis* cyanobacteria on Zarrouk modified medium at

2
a temperature of 28°C and lighting of 2500-3500 lux, for 20 days, separating the biomass from the culture fluid by filtration, diluting the filtrate 2-3 and, accordingly, 10-15 times.

The technical result of the invention consists in producing plant growth stimulants from *Nostoc halophilum* or *Spirulina platensis* with a high content of gibberellins.

Claims: 1

(54) Способ получения стимуляторов роста растений из цианобактерий**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии и сельскому хозяйству, в частности к получению стимуляторов роста растений из цианобактерий для использования в сельском хозяйстве и может быть использовано при культивировании злаковых, ароматических, бобовых растений.

Способ получения стимуляторов роста растений из цианобактерий включает культивирование цианобактерии *Nostoc halophilum* на среде Drew или цианобактерии *Spirulina platensis* на

2
модифицированной среде Zarrouk при температуре 28°C и освещении 2500-3500 люкс в течение 20 дней, отделение биомассы от культуральной жидкости фильтрованием, разбавление фильтрата в 2-3 и соответственно в 10-15 раз.

Технический результат изобретения состоит в получении стимуляторов роста растений из *Nostoc halophilum* или *Spirulina platensis* с повышенным содержанием гиббереллинов.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și agricultură, în special la obținerea biostimulatorilor produși de cianobacterii pentru utilizare în agricultură și poate fi folosită în domeniul fitotehniei, și anume la cultivarea gramineelor, plantelor aromatice, leguminoaselor.

Este cunoscut un procedeu de obținere a unor biostimulatori utilizați în agricultură, care constă în cultivarea cianobacteriilor *Anabaena ambigua* pe mediul cultural BG11 fără nitrat și a *Oscillatoria foreaui* pe BG11 cu nitrat, la temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ și iluminarea fluorescentă de $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Culturile au fost cultivate în camera de creștere (ciclu 12/12 h lumină/întuneric). Agitarea culturilor a fost efectuată în fiecare zi pentru a reduce aglomerarea celulelor. Culturile au fost recoltate prin centrifugare la 11,424 g timp de 20 de minute în fazele exponențiale (a 16-a zi pentru *A. ambigua* și a 12-a zi pentru *O. foreaui*) [1].

Neajunsul acestui procedeu constă în faptul că mediul utilizat la cultivarea tulpinelor din care se obține filtratul este BG11, care e mai costisitor, deoarece conține mai multe săruri în componență, ducând la sporirea costului de producție a biostimulatorului.

Cel mai apropiat după esența tehnică și rezultatul obținut este un procedeu de obținere a biostimulatorilor care constă în cultivarea cianobacteriilor *Anabaena oryzae*, *Nostoc ellipsosporum* și *Synechococcus* sp. în colbe Erlenmeyer (500 ml), în care a fost adăugat 200 ml de mediu de cultură BG11. Inoculul inițial a fost de aproximativ 2×10^4 celule/ml din stocul culturii la sfârșitul fazei logaritmice (7 zile de la începutul cultivării). Colbele cu cultură au fost menținute la $28 \pm 1^\circ\text{C}$, la intensitatea luminii de $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, timp de 21 de zile. Apoi culturile au fost centrifugate la 10000 rpm timp de 10 minute la 4°C , iar filtratul a fost supus dializei timp de 48 de ore pentru a elimina substanțele nutritive. Filtratul obținut a fost supus liofilizării la -45°C , resuspendat într-un volum de apă care constituie 10% din volumul inițial. Filtratele obținute în urma cultivării *Anabaena oryzae* conțin $0,71 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de gibereline, *Nostoc ellipsosporum* - $1,08 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, iar a *Synechococcus* sp.- $0,66 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în conținutul mai diminuat în filtrat al giberelinelor care stimulează germinarea mai rapidă a semințelor și creșterea plantelor, de asemenea procedeul include dializa, ceea ce conduce la reducerea conținutului de substanțe bioactive, inclusiv gibereline, precum și liofilizarea care majorează costul biostimulatorului. Alt dezavantaj este utilizarea mediului BG11 care este mai costisitor și sporește costul biostimulatorului.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de obținere a stimulatorilor de creștere a plantelor din cianobacterii care conțin cantități mai sporite de gibereline și pot fi utilizați în agricultură, și anume la germinarea semințelor și stimularea creșterii plantelor de cultură.

Esența invenției constă în faptul că se propune un procedeu de obținere a stimulatorilor de creștere a plantelor din cianobacterii, care include cultivarea cianobacteriei *Nostoc halophilum* pe mediul Drew sau a cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul Zarrouk modificat ce conține, g/l: NaNO_3 2,25, NaHCO_3 8,0, NaCl 1,0, K_2SO_4 0,3, Na_2HPO_4 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, CaCl_2 0,024, H_3BO_3 0,00286, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,00181, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,00008, MoO_3 0,000015, FeEDTA 1 ml/l, la temperatura de 28°C și iluminarea de 2500-3500 lx, timp de 20 de zile, separarea biomasei de lichidul cultural prin filtrare și diluarea filtratului de 2-3 și, respectiv, de 10-15 ori.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea stimulatorilor din cianobacterii *Nostoc halophilum* sau *Spirulina platensis* din filtrate care conțin cantități mai sporite de gibereline ($500 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ și respectiv $1100 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$), față de prototip (filtratele de *Anabaena oryzae* conțin $0,71 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ gibereline, de *Nostoc ellipsosporum* - $1,08 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, iar de *Synechococcus* sp.- $0,66 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$).

Rezultatul tehnic al invenției este cauzat de prezența în stimulatorii propuși a giberelinelor și a aminoacizilor, precum și a altor substanțe biostimulatoare, care activează procesele metabolice din plante.

Tabel

Substanțele biologic active din stimulatorii obținuți

Stimulatorul cercetat	Substanțele biologic active din filtrat	
	Cantitatea giberelinelor, $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	Aminoacizi mg/ml
Stimulator obținut din filtratul de la cultivarea <i>Nostoc halophilum</i>	500	0,074
Stimulator obținut din filtratul de la cultivarea <i>Spirulina platensis</i>	1100	0,065

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

5 Cianobacteria *Nostoc halophilum* se cultivă pe mediul de cultivare Drew la iluminarea de 2500 lx și temperatura de 28°C în colbe conice Erlenmeyer de 500 ml. La a 20 zi de cultivare biomasa se colectează prin filtrare, iar filtratul rezidual este colectat și diluat de 2-3 ori. Stimulatorul dat conține cantități sporite de gibereline și aminoacizi și poate fi utilizat în domeniul agriculturii ecologice pentru creșterea plantelor de cultură. Stimulatorul poate fi utilizat de exemplu la cultivarea busuiocului roșu *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* Benth. În rezultat biomasa recoltată sporește cu 22% față de plantele tratate cu apă. Utilizarea stimulatorului la încolțirea semințelor, de exemplu de porumb *Zea mays* L. contribuie la germinarea a 70% din semințe în comparație cu martorul tratat cu apă (60%).

Exemplul 2

15 Cianobacteria *Spirulina platensis* se cultivă timp de 20 zile pe mediul de cultivare Zarrouk modificat cu următoarea compoziție: NaNO₃ 2,25 g/l; NaHCO₃ 8,0 g/l; NaCl 1,0 g/l; K₂SO₄ 0,3 g/l; Na₂HPO₄ 0,2 g/l; MgSO₄·7 H₂O 0,2 g/l; CaCl₂ 0,024 g/l; soluția de microelemente 1 ml/l (H₃BO₃ 2,86 mg/l; MnCl₂·4H₂O 1,81 mg/l; CuSO₄·5H₂O 0,08 mg/l; MoO₃ 0,015 mg/l); FeEDTA 1ml/l, la iluminarea de 2500 lx și temperatura de 28°C în colbe conice Erlenmeyer de 500 ml. La a 20 zi de cultivare biomasa se colectează prin filtrare, iar filtratul rezidual este colectat și diluat de 10-15 ori.

20 Stimulatorul dat de asemenea conține cantități sporite de gibereline și aminoacizi și poate fi utilizat în domeniul agriculturii ecologice pentru creșterea plantelor de cultură. Stimulatorul poate fi utilizat, de exemplu, la cultivarea busuiocului roșu *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*. În rezultat biomasa recoltată sporește cu 25% față de plantele tratate cu apă.

Utilizarea stimulatorului dat la încolțirea semințelor, de exemplu, de porumb *Zea mays* L. contribuie la germinarea a 80% din semințe în comparație cu proba martor tratată cu apă (60%).

25 Avantajele aplicării invenției constau în utilizarea unui deșeu de producere din biotehnologie, și anume din cultivarea cianobacteriilor și utilizarea lui rațională la obținerea stimulatorilor de creștere naturali care stimulează germinarea semințelor și sporesc producția plantelor de cultură. Stimulatorii propuși contribuie la dezvoltarea agriculturii ecologice și obținerea producției bio.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Lakshmi P.T.V., Annamalai A. The effects of cyanobacterial (blue green algae) culture filtrates on the biomass and biochemicals of *Withania somnifera* Dunal. Asian Journal of Plant Sciences, 2008, v. 7, p. 37-43
2. Essa A.M.M., Ibrahim W.M., Mahmud R.M., ElKassim N.A. Potential impact of cyanobacterial exudates on seed germination and antioxidant enzymes of crop plant seedlings. Internasional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2015, v. 4(6), p. 1010-1024

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a stimulatorilor de creștere a plantelor din cianobacterii, care include cultivarea cianobacteriei *Nostoc halophilum* pe mediul Drew sau a cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul ce conține, g/l: NaNO₃ 2,25, NaHCO₃ 8,0, NaCl 1,0, K₂SO₄ 0,3, Na₂HPO₄ 0,2, MgSO₄·7H₂O 0,2, CaCl₂ 0,024, H₃BO₃ 0,00286, MnCl₂·4H₂O 0,00181, CuSO₄·5H₂O 0,00008, MoO₃ 0,000015, FeEDTA 1 ml/l, la temperatura de 28°C și iluminarea de 2500-3500 lx, timp de 20 de zile, separarea biomasei de lichidul cultural prin filtrare și diluarea filtratului de 2-3 și, respectiv, de 10-15 ori.