



MD 1206 Z 2018.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1206** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A01G 17/02* (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C05D 9/02 (2006.01)
C12R 1/065 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)
C12R 1/40 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2017 0024 (22) Data depozit: 2017.02.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.11.30, BOPI nr. 11/2017
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: VELIKSAR Sofia, MD; LEMANOVA Natalia, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de cultivare a butașilor de viță-de-vie pe soluri cu un conținut
excesiv de cupru**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la viticultură, și anume la un procedeu de cultivare a butașilor de viță-de-vie pe soluri cu un conținut excesiv de cupru.

Procedeu, conform invenției, prevede încorporarea în sol la plantarea butașilor a unei suspensii de bacterii ale tulpinilor *Azotobacter chroococcum* CNMN-AzB-01, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 și *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06 cu un consum de 0,7 L/butaș și

2

tratarea extraradiculară a butașilor cu o soluție apoasă a unui complex de microelemente Mn, Fe, Zn, B, Mo, Co, luate în raport de 1:1,95:0,23:0,44:0,001:0,001 corespunzător, suplimentat cu arginină, valină și acid succinic, cu un consum total de 30...50 ml/butaș.

Revendicări: 1

MD 1206 Z 2018.06.30

(54) Process for cultivation of grape seedlings on soils with an excessive content of copper

(57) Abstract:

1
The invention relates to viticulture, in particular to a process for cultivation of grape seedlings on soils with an excessive content of copper.

The process, according to the invention, provides for the incorporation into the soil upon plantation of seedlings of a suspension of *Azotobacter chroococcum* CNMN-AzB-01, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 and *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06 strains

2
bacteria at a flow rate of 0.7 L/seedling and extra-root treatment of seedlings with an aqueous solution of a complex of microelements Mn, Fe, Zn, B, Mo, Co, taken in the ratio of 1:1.95:0.23:0.44:0.001:0.001, respectively, enriched with arginine, valine and succinic acid, with a total consumption of 30...50 mL/seedling.

Claims: 1

(54) Способ культивирования виноградных саженцев на почвах с избыточным содержанием меди

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к виноградарству, а именно к способу культивирования виноградных саженцев на почвах с избыточным содержанием меди.

Способ, согласно изобретению, предусматривает внесение в почву при посадке саженцев суспензии бактерий штаммов *Azotobacter chroococcum* CNMN-AzB-01, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 и *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06 с

2
расходом 0,7 л/саженец и внекорневую обработку саженцев водным раствором комплекса микроэлементов Mn, Fe, Zn, B, Mo, Co, взятых в соотношении 1:1,95:0,23:0,44:0,001:0,001 соответственно, обогащенного аргинином, валином и янтарной кислотой, с общим расходом 30...50 мл/саженец.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

- 5 Invenția se referă la viticultură, și anume la un procedeu de cultivare a butașilor de viță-de-vie pe soluri cu un conținut excesiv de cupru.
- Luând în considerație necesitatea prelucrării plantelor multianuale contra bolilor cu preparate ce conțin cupru, contaminarea solului cu metale grele, în special cu cupru, este o problemă destul de serioasă pentru Moldova și alte țări, unde horticultura este
- 10 unul din cele mai importante domenii în agricultură.
- Este cunoscut un procedeu de fitoremediere – aplicarea plantelor hiperacumulatoare de metale grele pentru extragerea acestora din solul contaminat. În studiile noastre efectuate în anii 2008...2009 a fost demonstrat ca cultivarea plantelor – acumulatoare de Cu (trifoi, graminee furajiere), după defrișarea plantațiilor multianuale poate servi ca
- 15 unul din elementele de perspectivă a tehnologiei de fitoextragere a acestui element din sol [1].
- Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că a) nu este destul de eficient în cazul excesului de Cu în sol, care se întâlnește în unele podgorii de viță-de-vie, și b) există problema utilizării plantelor hiperacumulatoare de Cu după fitoremedierea solului.
- 20 În calitate de cea mai apropiată soluție poate servi un procedeu de bioremediere, care este mai eficient și mai potrivit decât fitoremedierea, de exemplu utilizarea diferitor microorganisme pentru detoxifierea solurilor contaminate cu metale grele, în particular a bacteriilor *Pseudomonas* la cultivarea lucernei pe soluri cu un conținut excesiv de cupru [2].
- 25 Cu toate acestea, pentru viță-de-vie cultivată pe soluri cu un conținut excesiv de cupru, care adesea depășește conținutul maxim admis de mai multe ori, un procedeu eficient nu există.
- Problema, pe care o rezolvă invenția propusă, constă în diminuarea efectului negativ al surplusului de Cu în sol prin îmbunătățirea regimului nutritiv, intensificarea fotosintezei și
- 30 sporirea creșterii și dezvoltării butașilor viței-de-vie.
- Procedeul, conform invenției, prevede încorporarea în sol la plantarea butașilor a unei suspensii de bacterii ale tulpinilor *Azotobacter chroococcum* CNMN-AzB-01, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 și *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06 luate în raport de 1:1:1, având un titru de 10^7 UFC/ml, cu un consum de 0,7 L/butaș și tratarea
- 35 extraradiculară a butașilor peste o lună după plantare și peste 2 și 4 săptămâni de la prima tratare cu o soluție apoasă de 0,09% a unui complex de microelemente Mn, Fe, Zn, B, Mo, Co, luate în raport de 1:1,95:0,23:0,44:0,001:0,001 corespunzător, suplimentat cu arginină, valină și acid succinic fiecare în cantitate de 10 ppm (în continuare preparatul Microcom-VA), totodată tratarea se efectuează cu un consum total
- 40 de 30...50 ml/butaș.
- Pentru pregătirea soluției nutritive se iau cantitățile necesare de fiecare microelement (pornind de la volumul soluției, care se pregătește, de exemplu 10 sau 100 litri), succesiv se dizolvă în apă, apoi se adaugă arginină, valină și acid succinic. Raportul dintre cantitatea totală a acizilor și microelementelor este de 1:6000 (MD 270 Y 2010.09.30).
- 45 Studiile au fost efectuate conform metodelor cunoscute utilizate în practica microbiologică (Большой практикум по микробиологии, Москва, Высшая школа, 1962, 490 p.). Bacteriile au fost cultivate pe medii minime de sare la temperatura de 27°C, 48 de ore, pentru a obține suspensii concentrate cu titrul de 10^9 CFU/ml. Determinarea titrului suspensiilor lichide concentrate s-a efectuat conform standardului de turbiditate. În
- 50 experimente au fost folosite pentru tratarea plantelor suspensiile de lucru cu un titru 10^7 CFU/ml.
- Rezultatul invenției constă în micșorarea toxicității cuprului conținut în solul pentru cultivarea viței-de-vie, ce se reflectă în menținerea conținutului pigmentilor fotosintetici și intensității fotosintezei în frunzele butașilor la un nivel sporit, fortificarea proceselor de
- 55 creștere și maturare a lăstarilor anuali cu 139,26 și 143,54% și în final – sporirea calității materialului săditor.
- Avantajul procedurii propus ține de perfecționarea regimului nutritiv al plantelor în condiții nefavorabile de creștere și sporirea toleranței plantelor de viță-de-vie la excesul de Cu în sol. Față de metoda de fitoremediere procedeul propus este ecologic, mai efektiv și mai
- 60 ieftin.

Exemplu de realizare a invenției

- Cercetările respective au fost efectuate în perioada anilor 2014...2016 în Complexul de vegetație al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM. Ca obiect de studiu au servit butașii cu 4 muguri, soiul Viorica, înrădăcinați în apă, apoi sădiți în vase cu sol (cernoziom carbonat) cu volumul de 11 kg de sol. Cuprul în formă de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ și în cantitate de 1200 mg a substanței active per 1 kg a fost adăugat în sol înainte de sădirea butașilor și acoperit cu 0,5 kg de sol. După aceasta a fost adăugată suspensia de 3 tulpini de bacterii *Azotobacter chroococcum* CNMN- AzB-01, *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 în raport 1:1:1 în cantitate de 10 ml/L de H_2O cu un consum total de 0,7 L la 10 kg de sol. Prima fertilizare extraradiculă a plantelor cu complexul de microelemente Microcom-VA a fost efectuată peste o lună, a doua și a treia – cu intervalul de 14 zile.

Schema experimentului include 3 variante în 3 repetări:

1. Martor
2. Cu - 1200 mg/kg
3. Cu - 1200 mg/kg + suspensia de *Az. chroococcum* + *B. subtilis* L + *Ps. putida* în sol (1 + 2 + 3) + Microcom -VA 0,09%.

- În faza creșterii intensive a plantelor a fost determinat conținutul de clorofilă în frunzele butașilor crescuți în condiții de exces de Cu folosind SPAD-502 meter (Minolta Inc., Osaka, Japan). În toate variantele cu Cu în sol conținutul pigmentilor fotosintetici este mai mic decât în varianta martor, ce indică despre efectul negativ al excesului de Cu. Aplicarea simultană a suspensiei de 3 tulpini de bacterii în sol cu tratarea extraradiculă a butașilor cu Microcom-VA menține conținutul de clorofilă în frunze pe parcursul vegetației la un nivel mai sporit comparativ cu cele 2 variante (vezi tabelul 1).

Tabelul 1. Efectul procedurii propus asupra intensității fotosintezei și conținutului total al pigmentilor fotosintetici în frunzele butașilor viței-de-vie crescuți în condiții de exces de cupru, soiul Viorica, 10. 2015

Variante	Prelevarea probelor			Intensitatea fotosintezei Mmol/m ² /s
	5.07.2016 mg/g m.p. M±m	4.07.2016 mg/g m.p. M±m	15.08.2016 mg/g m.p. M±m	
Martor	5,56±0,25	7,21±0,26	8,8±0,27	5,27±0,18
Cu -1200 mg/kg	5,08±0,36	7,01±0,28	8,3±0,22	3,81±0,27
Cu -1200 mg/kg + (1 + 2 + 3)* + Microcom-VA	6,98±0,36	8,22±0,35	9,19±0,48	5,53±0,25

- 30 *(1 + 2 + 3): suspensia de *Az. chroococcum*+ *B. subtilis* L + *Ps. putida* în sol

- Determinarea creșterii și maturării lăstarilor – unul din indicii principali ai calității butașilor viței-de-vie – la sfârșitul perioadei de vegetație a demonstrat încetinirea acestor procese în prezența cuprului în sol. În prezența metalului în cantități sporite (1200 mg/kg sol) creșterea și maturarea lăstarilor este mai slabă corespunzător cu 95,21 și 94,96% față de martor (Tabelul 2). Aplicarea procedurii revendicat a sporit evident creșterea și maturarea lăstarilor (cu 139,26 și 143,54 %).

Tabelul 2. Efectul procedurii propus asupra creșterii și maturării lăstarilor în condiții de exces de cupru, soiul Victoria, 10.2015

Varianta	Lungimea totală a lăstarilor, cm, M±m	% la martor	Lungimea matură a lăstarilor, cm M±m	% față de martor
Martor	22,13±1,49	100	9,14±0,79	100
Cu -1200 mg/kg	21,07±4,05	95,21	8,68±1,86	94,96
Cu -1200 mg/kg + (1 + 2 + 3) * + Microcom-VA	30,82±5,04	139,26	13,12±3,50	143,54

- 40 *(1 + 2 + 3): suspensia de *Az. chroococcum*+ *B. subtilis* L + *Ps. putida* în sol

- In experimentul analogic, montat in anul 2016, a fost confirmat efectul inhibitor al excesului de Cu asupra maturării lăstarilor și asupra masei rădăcinilor (Tabelul 3). Sistemul radicular al butașilor în condiții de exces de Cu este cu mult mai slab dezvoltat și constituie 77,83% față de martor. Îmbunătățirea regimului nutritiv al plantelor prin adăugarea suspensiei de bacterii și a complexului de microelemente Microcom-VA a micșorat impactul negativ al Cu asupra dezvoltării sistemului radicular. Se observă o tendință de sporire a creșterii rădăcinilor mai mici - de ordinul III-IV.

Tabelul 3. Efectul procedurii propus asupra creșterii butașilor viței-de-vie în condiții de exces de cupru, soiul Viorica, 11.2016

Variante	Lungimea matură a lăstarilor, cm $M \pm m$	% față de martor	Greutatea medie a rădăcinilor, g m. p., $M \pm m$	% față de martor
Martor	23,99±2,07	100	21,20±0,95	100
Cu -1200 mg/kg	22,16±1,24	92,37	16,50±0,69	77,83
Cu -1200 mg/kg + (1 + 2 + 3)* + Microcom-VA	27,01±1,28	112,58	16,81±1,47	79,29

*(1 + 2 + 3): suspensia de *Az. chroococcum* + *B. subtilis* L + *Ps. putida* în sol

- Așadar, s-a stabilit efectul inhibitor al excesului de cupru în sol asupra creșterii și maturării lăstarilor, dezvoltării sistemului radicular, conținutului pigmenților fotosintetici și intensității fotosintezei, ce afectează calitatea și micșorează cantitatea materialului săditor al viței-de-vie. A fost demonstrată posibilitatea de a micșora acest efect negativ prin aplicarea simultană a suspensiei de trei tulpini de bacterii *Azotobacter chroococcum* CNMN- AzB-01, *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 în raport 1:1:1 și a soluției apoase de complexul de microelemente Microcom-VA.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Veliksar S., Toma S., Kholodova V., Kuznetsov Vl., Bratco D. Accumulation of heavy metals by different plant species in conditions of copper excess. Universitatea de științe agricole și medicină veterinară "Ion Ionescu de la Brad". Lucrări științifice. Seria Horticultura. vol. 2, Iași, 2009
2. Ahemad M. Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. Arabian Journal of Chemistry, 2014, Găsit Internet: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214002688?via%3Dihub>>

(57) Revendicări:

Procedeu de cultivare a butașilor de viță-de-vie pe soluri cu un conținut excesiv de cupru, care prevede încorporarea în sol la plantarea butașilor a unei suspensii de bacterii ale tulpinilor *Azotobacter chroococcum* CNMN-AzB-01, *Bacillus subtilis* CNMN-BB-08 și *Pseudomonas putida* CNMN-PsB-06 luate în raport de 1:1:1, având un titru de 10^7 UFC/ml, cu un consum de 0,7 L/butaș și tratarea extraradiculară a butașilor peste o lună după plantare și peste 2 și 4 săptămâni de la prima tratare cu o soluție apoasă de 0,09% a unui complex de microelemente Mn, Fe, Zn, B, Mo, Co, luate în raport de 1:1,95:0,23:0,44:0,001:0,001 corespunzător, suplimentat cu arginină, valină și acid succinic fiecare în cantitate de 10 ppm, totodată tratarea se efectuează cu un consum total de 30...50 ml/butaș.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2017 0024 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2017.02.23 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) **Titlul: Procedeu de diminuare a toxicității cuprului pentru butașii viței-de-vie**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *A01G 17/02* (2006.01) *C12R 1/065* (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01) *C12R 1/125* (2006.01)
C05D 9/02 (2006.01) *C12R 1/40* (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

Int.Cl: *A01G 17/02 C12R 1/065*
A01N 63/00 C12R 1/125
C05D 9/02 C12R 1/40

Viță-de vie, Microcom, cupru, *Azotobacter*, *Bacillius*, *Pseudomanas*, microelemente

EA (Eapatis):

Int.Cl: *A01G 17/02 C12R 1/065*
A01N 63/00 C12R 1/125
C05D 9/02 C12R 1/40

Виноград, медь, тяжелые металлы, микроэлементы, *Azotobacter*, *Bacillius*, *Pseudomanas*

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 2654 F1 2005.01.31	1
A	MD 270 Y 2010.09.30	1
A	MD 652 Y 2013.07.31	1
A	MD 845 Y 2014.12.31	1
A	MD 973 Y 2015.12.31	1
A, D	Veliksar S., Toma S., Kholodova V., Kuznetsov Vl., Bratco D. Accumulation of heavy metals by different plant	1

	species in conditions of copper excess. Universitatea de științe agricole și medicină veterinară "Ion Ionescu de la Brad". Lucrări științifice. Seria Horticultura. vol. 2, Iași, 2009	
A, C	Ahemad M. Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. Arabian Journal of Chemistry, 2014, Găsit Internet: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214002688?via%3Dihub >	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2017.07.31

Examinator

COLESNIC Inesa