



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00897

(22) Data de depozit: 25.11.2013

(41) Data publicării cererii:
30.12.2014 BOPI nr. 12/2014

(71) Solicitant:
• TRANSPROIECT ORGANIC SRL,
SAT MALIC, ALEEA IRIS NR. 1, AP. 3,
COMUNA MALIUC, TL, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DOBRONAUTEANU EMANUEL
CORNELIU, INTRAREA BITOLIA NR. 28,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR FERTILIZANȚI DIN
VINASĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor fertilizanți din vinasă. Procedeu conform invenției constă în separarea unui concentrat de drojdie din vinasă, la care se adaugă zgură de oțelărie având un conținut de minimum 2,5% oxid de mangan și 25% oxid de fier, în proporție de 2 părți zgură la 98 părți vinasă, după care se adaugă și cărbune în proporție de 2 părți la 100 părți amestec vinasă zgură, se menține amestecul sub

agitare, pentru precipitarea acizilor humici, după care se supune filtrării, din care rezultă un filtrat azotat care se utilizează ca fertilizant F1, precum și un reziduu care se amestecă apoi cu cărbune vegetal, rumeguș de lemn și omogenizat de drojdie, în proporție de 6:44:40:10, rezultând un fertilizant organomineral F2.

Revendicări: 5



PROCEDEU DE OBȚINERE A UNOR FERTILIZANȚI DIN VINASA

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor fertilizanți din vinasă, (co)produs de la utilizarea melasei în procese industriale fermentative, în special de la fabricarea (bio)etanolului din melasă, respectiv a unui fertilizant organo-mineral, care conține acizi humici, și a unui fertilizant azotat cu acțiune osmo-protectantă datorită prezenței (glicin)betainei.

Sunt cunoscute diferite procedee prin care se urmărește valorificarea ca agro-fertilizanți a compușilor acumulați în vinasă, care au o valoare biologică ridicată pentru plante. Potasiul, prezent în vinasă în cantități care pot ajunge la peste 1%, reprezintă un element nutritiv major pentru plante. (Glicin)Betaina, prezentă în melasă în cantități mari, neutilizată de către drojdii în timpul fermentației alcoolice și concentrată în vinasă, este un donor de grupări metil, implicat în accelerarea ciclului metioninei (metionină – S-Adenozil-metionină – homocisteină – metionină). Acest ciclu al metioninei are rol în reglarea: (i) exprimării genelor prin metilare, inclusiv a răspunsului epigenetic la factorii de mediu, și (ii) lanțului de molecule semnal, intra- și inter-celular, poliamine – oxid nitric – peroxinitrit. Datorită acestei implicări în reglarea metabolismului unor compuși cheie, (glicin)betaina este un compus versatil cu importanță majoră în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici (a se vedea de ex. review-ul Ahmad *et al.*, 2013, Plant Biotech. Rep., 7: 49-57). Efectul osmoprotectant, de protejare a plantelor față de stresul hidric datorat lipsei de precipitații, secetei și/sau salinității, are implicații semnificative în actualul context al schimbărilor climatice, caracterizat de schimbarea tiparului precipitațiilor și creșterii riscului de secetă.

Problemele tehnice în utilizarea vinasei ca fertilizant / fertirigant sunt determinate de: (i) instabilitatea microbiologică a vinasei, datorită prezenței drojdiei de fermentație, inactivate parțial prin distilare, care face ca vinasă să nu poată fi păstrată ca atare mai mult de 10 zile; (ii) clastogenitatea / mutagenitatea prin aberații cromozomiale, determinată de melanoidinele / compușii humici (solubili) formați și acumulați în timpul tratamentelor termice repetate incluse în procedeele tehnologice care duc la obținerea melasei și apoi a vinasei (a se vedea de ex. da Silva *et al.*, 2013, Environ. Monit. Assess., 185: 1627-1636); (iii) toxicitatea pentru organismele acvatice a melanoidinelor solubile din vinasă aplicată ca fertirigant / fertilizant, care pot fi spălați din sol în apele de suprafață (a se vedea de ex. Botelho *et al.*, 2012,

Tox. Environ. Chem. 94:2035-2045); (iv) modificările nefavorabile ale caracteristicilor solurilor, ca urmare a aplicării vinasei, trecute recent în revistă de Christofolletti *et al.*, 2013, Waste Manag. 33:2752–2761, și în special depleția în mangan; (v) riscul semnificativ de formare a unor compuși melanoidinici toxici suplimentari, în cazul stabilizării (microbiologice) prin concentrare cu evaporarea apei, și riscul de încrustare a țevilor, din schimbătoarele de căldură și/sau concentratoarele prin evaporare, datorită precipitării sărurilor de calciu și magneziu prezente în vinasă; (vi) cantitățile mari de carbon organic total, biodegradabil de către flora microbiană, prezent în unele compoziții de vinasă, care determină indisponibilizarea pentru plante a azotului prezent în vinasă; (vii) necesitatea asigurării unei viteze mari a procedeelelor ridicate la scară, impusă de cantitățile importante de vinasă formate la fabricarea (bio)etanolului din melasă – de ex. aprox. 9 hl vinasă la 1 hl (bio)etanol.

Brevetul SUA 5 851 405 descrie un procedeu de clarificare și de recuperare a potasiului și a betainei din vinasă. Clarificarea vinasei se realizează după corectarea pH-ului, de preferat de la 6,5 la 7,5, pe un separator centrifugal, la 9000 x g. Vinasa clarificată este concentrată într-un evaporator circular, până la un conținut de solide de 59% până la 65%. Cristalele de sulfat de potasiu, care încep să se formeze de la circa 40% substanță uscată în vinasa concentrată, sunt îndepărtate prin decantare și filtrare pe un filtru presă, cu pământ de diatomee ca adjuvant de filtrare. Vinasa concentrată rezultată este diluată și supusă unei separări cromatografice de schimb ionic, pentru recuperarea betainei. Procedeu implică operații de concentrare, urmată de diluarea vinasei concentrate și de reconcentrarea eluatului cromatografic care conține betaina. În timpul procesului de concentrare, desfășurat la temperaturi ridicate, riscul formării de noi compuși melanoidinici (solubili) este ridicat. În cadrul procedurii descris prin brevetul SUA 5 851 405 nu sunt revendicate etape prin care acești compuși organici potențial periculoși să fie inactivați.

Cererea de brevet WO 2010/070622 descrie un procedeu de electro-flotație / oxidare, prin care se reduc carbonul organic total, consumul de oxigen și solidele totale din vinasă, inclusiv compușii melanoidinici potențial periculoși, care implică următoarele etape: introducerea vinasei în celule electrolitice prevăzute cu electrozi de oțel galvanizat, ajustarea pH-ului vinasei la o valoare cuprinsă între 7 și 14, de preferat între 7 și 11, aplicarea unei curenți constant, la o densitate de curenți cuprinsă între 20 și 40 mA/cm², injectarea, continuă sau secvențială, de peroxid de hidrogen în vinasă, în imediata vecinătate a electrozilor, într-o concentrație care este

cuprinsă între 10 și 67.000 ppm H₂O₂ pe litru de vinasă, de preferat între 1000 și 67.000 ppm H₂O₂ pe litru de vinasă, înlăturarea vinasei tratate din celula electrolitică și separarea solidele insolubile flocluate prin gravitație, filtrare sau centrifugare.

Un prim dezavantaj al procedeuului descris mai sus este utilizarea unor cantități relativ mari de apă oxigenată, compus relativ scump și care necesită precauții în utilizare. În plus procedeul descris nu include etape ulterioare de utilizare a vinasei purificate prin procedeul de electro-flotație / oxidare.

Autorii au perfecționat procedeul descris în WO 2010/070622 în cadrul cererii WO2011/158195, în care se floclurează este favorizată prin adăugarea unui co-adjuvant, supernatantul este re-introdus în faza de floclurare pentru a reduce suplimentar carbonul organic total, electrozii sunt de fier, oțel, carbon, aluminiu, sau o combinație a lor, pH-ul este în domeniu acid, între 4 și 5, încărcătura columbică a reactorului electrochimic este între 5000 și 10000 coulombi per litru, la o densitate a curentului între 0,3 și 2 mA/cm², peroxidul de hidrogen se reduce la max. 5000 ppm, iar solidele obținute prin floclurare sunt folosite pentru obținerea de (bio)combustibili sau agro-fertilizanți.

Procedeul perfecționat continuă să utilizeze cantități importante de apă oxigenată, de max. 5000 ppm., nu valorifică în scopuri agronomice betaina, reținută în supernatant și supusă unor degradări oxidative repetate, și nu tratează diferențiat compușii melanoidinici, în funcție de efectele lor benefice asupra plantelor sau potențial (geno)toxice.

O parte din materia organică îndepărtată prin procedeul de electro-flotație / oxidare este reprezentată de compuși melanoidinici din categoria acizilor humici – Hatano *et al.*, 2008, Chemosphere, 71:1730-1737. Acizii humici au un rol semnificativ în formarea solului – Tarchitzky *et al.*, 2000, Soil Sci. 165, 328– 342, și în favorizarea nutriției și creșterii plantelor - Nardi *et al.*, 2002, Soil Biol. Biochem., 34: 1527-1536, inclusiv datorită unor efecte asemănătoare fitohormonilor. Pentru a valorifica acești compuși cu efect benefic pentru plante cererea de brevet WO 2009/129589 prezintă un procedeu de obținere a unui fertilizant organo-mineral granulat, alcătuit din următoarele etape: concentrarea prin evaporare a vinasei până la 65% substanță uscată, amestecarea vinasei concentrate cu nămol de filtrare de la obținerea siropului de zahăr, uscat de preferință până a 10...20% umiditate reziduală, adăugarea de cenușă de la arderea bagasei de trestie de zahăr și/sau a altor resturi vegetale de trestie de zahăr, adăugarea de macro-nutrienți, primari (N, P,K) și

secundari (Ca, Mg, S), și de micro-nutrienți (Zn, Fe, Cu, Cl, Bo, Mn, Mo), pentru a obține diferite formulări agrochimice organo-minerale corespunzătoare diferitelor tipuri de aplicații necesare cultivării plantelor.

Procedeul descris mai sus este aplicabil numai în fabricile de (bio)etanol din trestie de zahăr, și nu se poate aplica și fabricilor de (bio)etanol obținut din melasă, de trestie de zahăr și/sau sfeclă de zahăr, în care nu se produce nămol de la filtrarea siropului de zahăr și cu atât mai puțin bagasă de trestie de zahăr. Procedeul implică etape în care consumul de energie este ridicat, cum este de exemplu etapa de concentrare prin evaporare a vinasei, și nu include măsuri de evitare a formării suplimentare de compuși melanoidinici potențial toxici.

Nici procedeul descris prin cererea de brevet WO 2009/129589 nu tratează diferențiat compușii melanoidinici în funcție de efectul lor, benefic în cazul acizilor humici, complexe moleculare cu solubilitate redusă, sau (potențial) toxic în cazul acizilor fulvici, melanoidine cu solubilitate mai ridicată în apă. În noua perspectivă asupra compușilor humici, reliefată de noile tehnici de investigație, prezentată pe larg de ex. de Sutton și Sposito, 2005, Environ. Sci. Technol., 39:9009-9015, acizii humici sunt complexe macromoleculare de compuși melanoidinici, stabilizate de inter-acții hidrofobe și de legături de hidrogen, insolubile la pH acid și solubilizate la pH bazic datorită destabilizării interacției hidrofobe, iar acizii fulvici sunt compuși melanoidinici solubili în apă, atât la pH acid, cât și la pH bazic, cu o prezență semnificativă a resturilor polare de (5metil)-2-furfural, formate prin deshidratarea termică a moleculelor de carbohidrați. Acizi humici, cu solubilitate scăzută și caracter hidrofob mai pronunțat, au un efect benefic asupra structurării și fertilității solului, ca și asupra nutriției și stimulării plantelor de cultură – a se vedea de ex. Schnitzer și Moreal, 2011, Advan. Agron., 113:139-213. În categoria generic denumită acizi fulvici, compuși melanoidinici cu o solubilitate pronunțată, și care au și o capacitate mai ridicată de trecere prin diferitele bariere de permeabilitate din diferitele organisme, sunt incluse și melanoidinele solubile responsabile de clastogenitatea / mutagenitatea prin aberații cromozomiale și de toxicitatea pentru organisme acvatice a compușilor spălați din solurile fertilizate / fertirigate cu vinasă.

Vinasa are un conținut ridicat de acizi fulvici și redus în acizi humici - Tejada și Gonzalez, 2005, Europ. J. Agron. 23: 336-347. Rolul manganului în catalizarea humificării abiotice, demonstrată de ex. de către Jokic *et al.*, 2001, Geophys. Res. Lett., 28: 3899-3902., explică și depleția în mangan a solurilor tratate cu cantități mari

de vinasă cu acizi fulvici / melanoidine solubile, compuși incomplet humificați, care descresc conținutul de mangan din soluri, prin complexare și modificare a stării de oxidare, ca urmare a reacțiilor de humificare până la acizi humici.

Este deci necesară dezvoltarea unui procedeu prin care să valorifice și beneficiile agronomice ale acizilor humici din vinasă, limitându-se riscurile asociate compușilor melanoidinici solubili / acizilor fulvici din vinasă. Obiectul acestei invenții este de a descrie un astfel de procedeu, prin care să se realizeze reacții de humificare la acizi humici a acizilor fulvici din vinasă, și care să permită valorificarea completă a melanoidinelor din vinasă, prin obținerea de agro-fertilizanți organici / organo-minerali, cu risc redus de afectare a diferitelor componente ale mediului.

Procedeul conform invenției constă în următoarele etape:

- ✓ Separarea unui concentrat de drojdie din vinasă, care conține cel puțin 10% drojdie, prin utilizarea unui separator centrifugal, la min. 8500 x g, omogenizarea sub presiune a concentratului de drojdie, răcirea omogenizatului și menținerea lui la 4°C până la utilizarea ulterioară;
- ✓ Aducerea pH-ului vinasei clarificate la valoarea 4 și adăugarea de zgură de oțelărie, în proporție de 2 părți zgură la 98 părți vinasă, și menținerea la 60°C, sub agitare, 20 rpm, și aerare, 0,2 litri aer / litru mediu / min, timp de 12 ore, pentru a favoriza catalizarea reacției de humificare de către oxizii de mangan și fier prezenți în zgura de oțelărie;
- ✓ Răcirea amestecului la 25°C, modificarea pH-ului amestecului la 3,5 și adăugarea de bio-cărbune, în raport de 2 părți bio-cărbune la 100 părți amestec vinasă – zgură de oțelărie, și menținerea, sub agitare, 20 rpm, timp de 3 ore;
- ✓ Modificarea pH-ului amestecului vinasă – zgură de oțelărie - bio-cărbune la 1,5 unități pH, menținerea la 25°C sub agitare, 20 rpm, timp de 20 min pentru finalizarea precipitării acizilor humici, pre-existenți și formați prin cataliza mediată de oxizii de fier și mangan;
- ✓ Filtrarea amestecului de vinasă – zgură de oțelărie – bio-cărbune, pe un filtru rotativ cu presiune, 0,6 MPa, cu separarea unui filtrat F1, care este utilizabil ca fertilizant cu conținut ridicat de (glicin)betaină și a unui precipitat P;
- ✓ Amestecarea precipitatului P reținut pe filtru, cu o umiditate reziduală de 20%, cu biocărbune cu umiditate reziduală de 6%, cu rumeguș de lemn de rășinoase cu umiditatea reziduală de 14% și cu omogenizat de drojdie cu umiditate de 85%, în raport de 6 părți precipitat P : 44 părți bio-cărbune : 40 părți rumeguș de lemn de

conifere : 10 părți omogenizat de drojdie, și densificarea amestecului prin presare într-o presă de peleți cu matrițe orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5...8 mm, care reprezintă agro-fertilizantul organo-mineral F2.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

- ✓ Omogenizarea sub presiune a concentratului de drojdie prin trecere printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, 2 cicluri la 150 MPa și acidifierea omogenizatului la pH 2,0 cu acid fosforic;
- ✓ Zgura de oțelărie utilizată pentru a cataliza oxidarea acizilor fulvici și coagularea lor în complexe de acizi humici, conține cel puțin 2,5% oxid de mangan și 25% oxizi de fier;
- ✓ Bio-cărbunele, cu un volum specific microporos, W_o , de cel puțin $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ și cu o suprafață specifică a microporilor, S_{micro} , de min. $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, este obținut prin piroliza asistată de micro-unde, a unui amestec de borhot de porumb, de la fabricarea alcoolului etilic, și tulei de porumb, 25...50% borhot de porumb : 50 ... 75% tulei de porumb, iar piroliza asistată de micro-unde se realizează prin expunerea la micro-unde, cu o putere incidentă de 1000 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, a amestecului borhot de porumb – tulei de porumb
- ✓ Densificarea amestecului precipitat P: bio-cărbune: rumeguș de lemn: omogenizat de drojdie se face la o putere specifică de 1 kW pentru $0,015 \dots 0,02 \text{ m}^2$ suprafața a matricei, cu menținerea temperaturii amestecului de peletizat la circa 65°C .

Procedurul, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- Valorifică toți compușii din vinasă, care au valoare biologică ridicată pentru plante, inclusiv drojdia de fermentație, în agro-fertilizanți organici;
- Asigură o stabilitate ridicată la păstrare pentru agro-fertilizanții rezultați, în cazul fertilizantului F1 datorită stabilizării prin reducerea pH-ului și prin înlăturarea unor substanțe organice ușor degradabile, iar în cazul fertilizantului organo-mineral F2 datorită peletizării în granule cu umiditatea de max. 15%.
- Reduce riscurile de mediu asociate melanoidinelor solubile datorită: (i) humificării / oxidării urmată de asocierea în complexe de tip acizi humici, catalizate de oxizii de mangan și fier din zgura de oțelărie și (ii) fixării în structura spongioasă de bio-cărbune a eventualelor melanoidine rămase solubile / incomplet humificate sub acțiunea catalitică a zguri de oțelărie;

- Evită procedeele de stabilizare a vinasei prin tratamente termice de concentrare prin evaporare, energofage și potențial generatoare a unor noi melanoidine solubile;
- În fertilizantul F1 reduce raportul C:N, crescând biodisponibilitatea azotului pentru plante;
- Nu implică costuri investiționale foarte semnificative, pentru că nu necesită utilaje dedicate, ci cu utilaje sunt folosite în diferite ramuri ale industriilor de proces, și care, datorită unei piețe diversificate au costuri de vânzare mai reduse;
- Permite ridicarea ușoară la scară și procesarea în timp real a unor cantități mari de vinasă.

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

Exemplu. Din vinasă colectată la distilarea melasei fermentate se separă un concentrat de drojdie, care conține cel puțin 10% drojdie și 2% bio-cărbune, prin centrifugare pe o centrifugă continuă de laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1-02-175 (GEA Westfalia Separator Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare de 10.000 rpm, echivalent a 8500 x g; la o rată de alimentare de 1 litru/min, cu separarea continuă a vinasei clarificate și discontinuă a concentratului, ajuns la o densitate de 1100 kg/m³. Concentratul de drojdie se omogenizează într-un omogenizator cu piston, GEA Niro Soavi Arriete NS2006 (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, două cicluri la 150 MPa. Omogenizarea la înaltă presiune determină inactivarea celulelor microbiene prin liză indusă de variațiile de presiune și trecerea prin valva tip „muchie de cuțit. Omogenizatul de drojdie se răcește, se acidifică la pH 2,0 cu acid fosforic și se menține într-un recipient răcit la 4°C până la utilizare ulterioară.

Într-un vas de reacție de 150 litri capacitate totală și 100 litri capacitate de lucru, prevăzut cu agitare, se aduc 98 kg de vinasă clarificată, al cărui pH se corectează la valoarea 4, prin adaos de acid fosforic sau hidroxid de potasiu. Vinasă se aduce la temperatura de 60°C, și se adaugă 2 kg zgură de oțelărie. Se menține la 60°C, sub agitare, 20 rpm, și aerare, 0,2 litri aer / litru mediu / min, timp de 12 ore, pentru a favoriza catalizarea reacției de humificare de către oxizii de mangan și fier prezenți în zgura de oțelărie.

Zgura de oțelărie utilizată conține cel puțin 2,5% oxid de mangan și 25% oxizi de fier. Conținutul de oxizi de mangan și de oxizi de fier se determină de exemplu pe

un spectrometru de fluorescență de raze X cu dispersie după energie, PW 4025 MiniPal (PANalytical, Almelo, Olanda).

Amestecul vinasă clarificată – zgură de oțelărie se răcește la 25°C, pH-ul se modifică la 3,5 și se adaugă 2 kg de bio-cărbune. Se menține, sub agitare, 20 rpm, timp de 3 ore.

Bio-cărbunele folosit în amestecul de mai sus are un volum specific microporos, W_o , de cel puțin $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ și cu o suprafață specifică a microporilor, S_{micro} , de min. $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, și este obținut prin piroliza asistată de micro-unde a unui amestec de borhot de porumb, de la fabricarea alcoolului etilic, și tului de porumb.

Volumul microporos specific, W_o , al bio-cărbunelui activat a fost calculat din partea lineară a funcției Dubinin–Radushkevich (Stoeckli *et al.*, 2001, Carbon 39: 115–1116), după determinarea unei izoterme de adsorbție în azot lichid la 77 K, folosind un analizor de fiziosorbție (Micromeritics ASAP 2020, Micromeritics, Norcross, GA, SUA). Suprafața specifică a microporilor a fost estimată raportând valorile obținute pentru volumul microporos specific la dimensiunea medie a porilor (Stoeckli, 1996, în: Patrick, J. (Ed.), Porosity in Carbons – Characterization and Applications. Arnold, London, pp. 67–92).

Orice alt tip de (bio)cărbune cu capacități de absorbție a compușilor melanoidinici, care are caracteristicile menționate mai sus, se poate folosi în cadrul acestui exemplu.

Se modifică pH-ului amestecului vinasă – zgură de oțelărie - bio-cărbune la 1,5 unități pH, se menține la 25°C sub agitare, 20 rpm, timp de 20 min pentru finalizarea precipitării acizilor humici, pre-existenți și formați prin cataliza mediată de oxizii de fier și mangan. Amestecul de vinasă – zgură de oțelărie – bio-cărbune se separă pe un filtru cu presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen, Sonthofen, Germania), la 0,6 MPa, separându-se un filtrat F1, care este utilizabil ca fertilizant cu conținut ridicat de (glicin)betaină și un precipitat P. 6 kg din precipitatul P reținut pe filtru, cu o umiditate reziduală de 20%, se amestecă într-un malaxor FG3 (Unimec, Siena, Italia) cu 44 kg biocărbune cu umiditate reziduală de 6%, cu 40 kg rumeguș de lemn de confiere, cu umiditatea reziduală de 14% și cu 10 părți omogenizat de drojdie cu umiditate de 85%. Amestecul rezultat se densifică folosind o presă (moară) de peleți cu matrițe orizontale, model Kahl 14-175 (Amandus Kahl, Reinbek / Hamburg, Germania), la o putere specifică de 1 kW pentru $0,015 \dots 0,02 \text{ m}^2$, cu menținerea temperaturii amestecului de peletizat la circa 65°C, pentru a forma peleți cu lungimea

de aprox. 15 mm și diametrul de 5..8 mm, care reprezintă agro-fertilizantul organo-mineral F2.

În vinasă clarificată prin centrifugare și în filtratul F1 s-au determinat o serie de caracteristici chimice. Materia organică a fost determinată conform SR EN 13039:2012. Pentru a determina acizii humici și fulvici din vinasă și din filtratul F1 au fost prelevate probe care au fost extrase cu pirofosfat de sodiu 0,1 M și hidroxid de sodiu 0,1 M. Supernatantul a fost acidificat la pH 2 cu HCl și menținut peste noapte la 24 ore la temperatura camerei. Pentru a separa acizi humici de acizii fulvici, soluția a fost centrifugată, iar precipitatul cu acizi humici a fost dizolvat cu hidroxid de sodiu 2 M (Yeomans și Bremner, 1988, Comm. Soil Sci. Plant Anal., 19:1467–1476). Conținutul de carbon în acizii humici și în acizii fulvici a fost determinat prin metoda Sims și Adonis, 1971, Soil Sci., 112:137–141. Fosforul total a fost determinat conform SR EN 13346:2002, azotul total a fost determinat prin metoda Kjeldahl, iar potasiul și sodiul au fost determinați prin flamfotometrie. Conținutul de betaină a fost determinat prin lichid cromatografie de înaltă presiune, conform metodei descrise de Chendrimada *et al.*, 2002, J. Sci. Food Agric., 82:1556-1563. Rezultatele sunt prezentate în tab.1 de mai jos.

Tab. 1. Caracteristicile chimice ale vinasei clarificate și ale filtratului F1 (media a trei determinări).

Caracteristică	Vinasă clarificată	Filtrat F1
Materie organică (g.Kg ⁻¹)	112,4	82,2
Acizi humici – C (g.Kg ⁻¹)	0,6	0,03
Acizi fulvici – C (g.Kg ⁻¹)	21,2	0,6
Azot total (g.Kg ⁻¹)	6,4	5,8
Fosfor (mg.Kg ⁻¹)	6,8	7,4
Potasiu (g.Kg ⁻¹)	12,4	10,5
Sodiu (g.Kg ⁻¹)	5,3	4,8
Betaina (g.Kg ⁻¹)	18,7	16,5

În filtratul F1, rezultat ca urmare a aplicării procedurii descris mai sus, se constată o reducere semnificativă a conținutului de melanoidine, acizi humici și acizi fulvici, Conținutul de betaină se menține ridicat, iar raportul C:N este favorabil acțiunii ca fertilizant cu aport de azot disponibil pentru plante.

În agro-fertilizantul organo-mineral F2 s-au efectuat determinări ale conținutului de acizi humici, folosind metodele prezentate mai sus. Conținutul de acizi

humici-C, determinat în agro-fertilizantul F2, este de 15,7 g. kg⁻¹, cu mult peste conținutul de acizi humici determinați în vinasa inițială, rezultat care demonstrează humificarea melanoidinelor de către zgura de oțelărie / oxizii de mangan și fier prezenți în zgură în cadrul procedurii prezentat mai sus.

S-a testat fitotoxicitatea vinasei clarificate și a filtratului F1 folosind biotestul plantulelor de fasole mung (*Vigna radiata*). Boabele de *V. radiata* (cv. Pusa Bold) au fost sterilizate la suprafață prin spălări repetate cu hipoclorit de sodiu. Semințele au fost depuse în plăci Petri Ø 25 cm, sterile, pe hârtie de filtru sterilizată, umezită cu câte 10 ml de vinasă clarificată și de filtrat F1. Plăcile Petri au fost menținute la temperatura camerei, timp de 2 săptămâni, după care s-au numărat frunzele formate și s-au efectuat determinări ale lungimii, masei umede și masei uscate, pentru tulpina și rădăcina plantulelor. Se constată că, în urma aplicării procedurii și reducerii conținutului de melanoidine solubile, fitotoxicitatea inițială a vinasei clarificate este mult redusă – tab.2.

Tab. 2. Influența aplicării vinasei clarificate și a filtratului F1 asupra plantulelor de fasole mung (*Vigna radiata* cv. Pusa Bold)

Parametru plantulă	Vinasă clarificată	Filtrat F1
Lungimea tulpinii (cm)	0,68 ± 0,05	5,12 ± 1,28
Lungimea rădăcinii (cm)	1,62 ± 0,83	3,52 ± 0,67
Masa umedă a rădăcinii (mg)	8,12 ± 0,53	93,81 ± 5,12
Masa umedă a tulpinii (mg)	56,32 ± 0,87	116,40 ± 10,78
Masa uscată a rădăcinii (mg)	1,65 ± 0,08	38,71 ± 18,29
Masa uscată a tulpinii (mg)	8,28 ± 0,12	137,83 ± 18,67
Număr de frunze	0,50 ± 0,17	1,97 ± 0,16

S-au realizat determinări ale toxicității pentru organisme acvatice ale vinasei clarificate, filtratului F1 și a unui levigat din fertilizantului organo-mineral F2. S-au efectuat bioteste cu organisme acvatice model, cnidaria *Hydra attenuata*, alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (cunoscută ca *Selenastrum capricornutum*), și (micro)crustaceele *Daphnia magna* și *Daphnia similis*. Pentru cultivare și determinările (eco)toxicologice pe *P. subcapitata* și *H. attenuata* s-au folosit procedurile descrise de metoda OECD TG201-2006 / ISO 8692-2005 [ENV/JM/MONO(2008)28], și, respectiv, Trottier *et al.* 1997, Toxicol. Water Qual. 12, 265–271. Pentru determinările ecotoxicologice cu *D. magna* și *D. similis* s-a folosit

metoda OECD TG202-2004 / ISO 6341-2005 [ENV/JM/MONO(2008)28]. Toxicitatea a fost estimată prin metoda modificată Spearman–Karber (Hamilton *et al.*, 1977, Environ Sci. Techn. 11: 714-719), folosind o funcție adăugată la Excel Microsoft Office 2010 (Microsoft, Redmont, WA, SUA), și testul Tukey din pachetul software SAS/STAT 12.2. (SA Institute, Carry, NC, SUA), pentru determinarea nivelului de semnificație $P < 0,01$. S-au obținut diverse valori ale EC_{50} , LC_{50} și IC_{50} . Pentru *H. attenuata*, valorile concentrației efective (EC_{50}) au fost calculate pe baza apariției oricăror modificări morfologice și efecte sub-letale pe 50% din populația testată. Pentru *D. magna* și *D. similis*, concentrația letală (LC_{50}) este concentrația care determină imobilizarea și lipsa la stimula a 50% din populația de micro-crustacee pe care s-a realizat experimental, iar pentru *P. subcapitata* s-a calculat concentrația inhibitorie (IC_{50}), ca fiind concentrația care inhibă creșterea a 50% din populația testată, comparativ cu un martor netratat.

Levigatul din fertilizantului organo-mineral F2 s-a obținut prin spălarea repetată de cinci ori, a 100 g de fertilizant, cu 1 litru de apă deionizată.

Rezultatele sunt prezentate în tab. 3. de mai jos.

Tab.3. Valorile* IC_{50} , LC_{50} și EC_{50} ale vinasei clarificate, filtratului F1 și a unui, față de diferite organisme acvatice

VARIANTĂ	<i>P. capitata</i> IC_{50}	<i>D. magna</i> LC_{50}	<i>D. similis</i> LC_{50}	<i>H. attenuata</i> EC_{50}
Vinasa clarificată	0,83	1,18	2,33	0,67
Filtrat F1	10,23	12,33	14,11	11,53
Levigat fertilizant F2	68,33	73,67	78,67	67,22

*% din mediul de creștere al respectivelor organisme acvatice.

Rezultatele demonstrează eficacitatea procedurii propus prin invenției în reducerea toxicității determinate de compuși melanoidinici prezenți în vinasa inițială. Toxicitatea care apare în cazul filtratului F1 este determinată de reducerea pH-ului în mediul de creștere, și nu de compușii melanoidinici. Efectele aparent toxice care au fost evidențiate în cazul levigatului din fertilizantului organo-mineral F2 sunt determinate în principal de lipsa de hrană rezultată din diluarea excesivă a mediului de cultură, și nu ca urmare a levigării unor compuși melanoidinici toxici.

A fost testată eficacitatea fertilizantului F2 ca osmoprotectant, pentru protecția plantelor de tomate față de stresul hidric. Plantele de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Cristal 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). 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 60 zile. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai o singură dată, după 30 zile de la transplantare, prin aplicarea a 55 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$, Eurofertil, TimacAgro Romania). Experimentul a fost organizat în bloc randomizat cu câte 4 repetiții pentru fiecare variantă, fiecare repetiție incluzând câte 5 plante. Ca produs de referință a fost folosită glicinbetaină purificată (99%, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, SUA), variantele testate experimental incluzând și martori tratați cu apă, stresat hidric și nestresat. Tratamentele au implicat aplicarea de soluții de fertilizant 7,5% F1 și glicin-betaină 10 mM, câte 55 ml per kg de substrat (echivalent a $300\text{ m}^3/\text{ha}$, pentru orizontul de sol 0-45 cm), de două ori, o dată ca tratament al substratului de creștere, cu 5 zile înainte de transplantare, și a doua oară după 30 zile, prin includere în soluția nutritivă de îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$), ca soluții de fertilizant 7,5% F1 și glicin-betaină 10 mM. Variantele experimentale au fost:

V_1 – martor nestresat hidric, tratat cu apă; substrat inițial tratat cu 55 ml apă per kg, echiv. $300\text{ m}^3/\text{ha}$, fertilizare 55 ml soluție 1g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) per kg substrat;

V_2 – martor stresat hidric, tratat cu apă, substrat inițial tratat cu 55 ml apă per kg, echiv. $300\text{ m}^3/\text{ha}$, fertilizare soluție 1g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) per kg substrat;

V_3 – nestresat hidric, tratat cu glicinbetaină, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 10 mM glicinbetaină per kg, fertilizare cu 55 ml soluție 1g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) și 10 mM glicinbetaină, per kg substrat;

V_4 – stresat hidric, tratat cu glicinbetaină, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 10 mM glicinbetaină per, fertilizare cu 55 ml soluție 1g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) și 10 mM glicinbetaină, per kg substrat;

V_5 – nestresat hidric, tratat cu fertilizant F1, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 7,5% fertilizant F1, fertilizare cu 55 ml soluție 1g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) și 7,5% fertilizant F1, per kg substrat;

V₆ – stresat hidric, tratat cu fertilizant F1, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 7,5% fertilizant F1, fertilizare cu 55 ml soluție 1g/l îngrășământ mineral 20-8-20 (N–P₂O₅–K₂O) și 7,5% fertilizant F1, per kg substrat.

Martorul nestresat hidric a fost udat o dată la cinci zile la 100% capacitate de câmp (55 ml la 1 kg substrat), iar variantele stesate hidric au fost udate la zece zile la 100% capacitate de câmp. La sfârșitul celor 60 zile de la transplantare s-a desființat experiența, determinându-se parametri morfologici ai plantelor, respectiv înălțimea plantelor, lungimea rădăcinii. Datele au fost prelucrate prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4 de mai jos. Fertilizantul F1, obținut conform exemplului de realizarea a invenției, aplicat ca tratament prin udare a solului, în concentrația de 7,5%, respectiv 1,23 g/l glicinbetaină, are o activitatea similară soluției standard de glicin-betaină purificată, în ceea ce privește limitarea efectelor stresului hidric la plantele de tomate și stimularea plantelor nestresate.

Tab. 4. Influența tratamentelor cu compoziții realizate conform invenției asupra plantelor de tomate, stesate și nestresate hidric*.

VARIANTĂ EXPERIMENTALĂ	ÎNĂLȚIME plante (cm)	LUNGIME rădăcini (cm)	NUMĂR frunze	SUPRAFAȚĂ frunze (mm ²)	PRODUCȚIE medie** (g fructe coapte / plantă)
V ₁ maror nestresat hidric, tratat cu apă	57,85±1,84a	54,24±3,78ab	32,00±3,1a	672,47±16,21a	307±58,6ab
V ₂ maror stresat hidric, tratat cu apă,	44,04±4,42c	38,45±4,27c	25,00±3,2b	527,80±12,93c	202±32,6c
V ₃ ne-stresat hidric, 2 tratamente glicinbetaină 10 mM	58,30±2,42a	58,50±3,39a	34,00±2,1a	687,58±14,92a	353±28,2a
V ₄ stresat hidric, 2 tratamente glicinbetaină 10 mM	52,50±2,89b	49,80±4,88b	30,00±4,2ab	563,16±15,84b	282±38,6b
V ₅ ne-stresat hidric, 2 tratamente soluție 7,5% fertilizant F1	59,50±3,64a	57,20±2,82a	32,01±2,6a	682,16±8,24a	369±35,6a
V ₆ stresat hidric, 2 tratamente soluție 7,5% fertilizant F1	51,80±2,42b	48,72±4,22b	29,01±3,6ab	572,16±8,24b	279±35,6a

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

S-a realizat și un experiment de testare a eficacității agro-fertilizantului organo-mineral F2 în nutriția plantelor ornamentale. S-a lucrat cu butași de mușcată hibridă (*Pelargonium x hortorum*) cv. „Moulin Rouge”. Butași uniformi, ca dezvoltare a rădăcinilor și tulpinii, au fost plantați în ghivece de plastic de 25 cm, conținând un substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți (Canna Terra Professional Plus, Canna

International BV). Ghivecele 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 $500 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai după trei săptămâni de creștere, prin aplicarea a 55 ml / kg soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20–8–20 (N–P₂O₅–K₂O, Eurofertil, TimacAgro).

Experimentul de testare a inclus următoarele variante:

V₁ - martor netratat cu agro-fertilizant organo-mineral

V₂ – martor tratat cu un produs de referință, obținut prin peletizarea în condiții similare a unui amestec de 2 părți zgură de oțelărie, 48 kg bio-cărbune și 52 kg rumeguș de lemn de conifere, 4 g per kg de substrat, echivalent 21,6 tone/ha;

V₃ – tratat cu agrofertilizant organo-mineral F2, 4 g per kg de substrat, echivalent 21,6 tone/ha;

V₄ - tratat cu agrofertilizant organo-mineral F2, 6 g per kg de substrat, echivalent 32,4 tone/ha.

Fiecare variantă a inclus 12 ghivece, care au fost aranjate în blocuri de câte trei per repetiție, într-o schemă randomizată de tip pătrat latin, 4 variante în 4 repetiții. La 12 săptămâni de la transplantarea butașilor a fost cântărită masa proaspătă și cea uscată a rădăcinilor și a părților aeriene ale plantelor de mușcată. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft).

Tab. 5. Efectul tratamentelor cu agro-fertilizant organo-mineral asupra creșterii plantelor de mușcată de mușcată.

Variantă experimentală	Masă rădăcină, g		Masă tulpină, g	
	proaspătă	uscată	proaspătă	uscată
V ₁ - martor netratat fertilizanți organo-minerali	13,54b	1,74b	107,16c	14,83c
V ₂ – 4 g/kg substrat produs referință	14,08ab	2,34a	116,41b	16,35b
V ₃ - 4 g/kg fertilizant organo-mineral F2	16,62a	2,45a	128,74a	18,24a
V ₄ - 6 g/kg fertilizant organo-mineral F2	16,68a	2,54a	126,41a	18,35a
DL 5%	1,72	0,35	9,24	1,07

Rezultatele prezentate în tab. 5 demonstrează un efect de stimulare a creșterii plantelor ornamentale de mușcată, sub influența tratamentelor cu fertilizant organo-mineral F2.

REVENDICARI

1. Procedeul conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: separarea unui concentrat de drojdie din vinasă, care conține cel puțin 10% drojdie, prin utilizarea unui separator centrifugal, la min. 8500 x g, omogenizarea sub presiune a concentratului de drojdie, răcirea omogenizatului și menținerea lui la 4°C până la utilizarea ulterioară; aducerea pH-ului vinasei clarificate la valoarea 4 și adăugarea de zgură de oțelărie, în proporție de 2 părți zgură la 98 părți vinasă, și menținerea la 60°C, sub agitare, 20 rpm, și aerare, 0,2 litri aer / litru mediu / min, timp de 12 ore, pentru a favoriza catalizarea reacției de humificare de către oxizii de mangan și fier prezenți în zgura de oțelărie; răcirea amestecului la 25°C, modificarea pH-ului amestecului la 3,5 și adăugarea de bio-cărbune, în raport de 2 părți bio-cărbune la 100 părți amestec vinasă – zgură de oțelărie, și menținerea, sub agitare, 20 rpm, timp de 3 ore; modificarea pH-ului amestecului vinasă – zgură de oțelărie - bio-cărbune la 1,5 unități pH, menținerea la 25°C sub agitare, 20 rpm, timp de 20 min pentru finalizarea precipitării acizilor humici, pre-existenți și formați prin cataliza mediată de oxizii de fier și mangan; filtrarea amestecului de vinasă – zgură de oțelărie – bio-cărbune, pe un filtru rotativ cu presiune, 0,6 MPa, cu separarea unui filtrat F1, care este utilizabil ca fertilizant cu conținut ridicat de (glicin)betaină și a unui precipitat P; amestecarea precipitatului P reținut pe filtru, cu o umiditate reziduală de 20%, cu biocărbune cu umiditate reziduală de 6%, cu rumeguș de lemn de rășinoase cu umiditatea reziduală de 14% și cu omogenizat de drojdie cu umiditate de 85%, în raport de 6 părți precipitat P : 44 părți bio-cărbune : 40 părți rumeguș de lemn de conifere : 10 părți omogenizat de drojdie, și densificarea amestecului prin presare într-o presă de peleți cu matrițe orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5...8 mm, care reprezintă agro-fertilizantul organo-mineral F2.

2. Procedeul conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** omogenizarea sub presiune a concentratului de drojdie prin trecere printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, 2 cicluri la 150 MPa și acidifierea omogenizatului la pH 2,0 cu acid fosforic.

3. Procedeul conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** zgura de oțelărie utilizată pentru a cataliza oxidarea acizilor fulvici și coagularea lor în complexe de acizi humici, conține cel puțin 2,5% oxid de mangan și 25% oxizi de fier;

4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** bio-cărbune utilizat, cu un volum specific microporos, W_o , de cel puțin $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ și cu o suprafață specifică a microporilor, S_{micro} , de min. $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, este obținut prin piroliza asistată de micro-unde, a unui amestec de borhot de porumb, de la fabricarea alcoolului etilic, și tulei de porumb, 25...50% borhot de porumb : 50 ... 75% tulei de porumb, iar piroliza asistată de micro-unde se realizează prin expunerea la micro-unde, cu o putere incidentă de 1000 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, a amestecului borhot de porumb – tulei de porumb.

5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** densificarea amestecului precipitat P: bio-cărbune: rumeguș de lemn: omogenizat de drojdie se face la o putere specifică de 1 kW pentru $0,015 - 0,02 \text{ m}^2$ suprafața a matricei, cu menținerea temperaturii amestecului de peletizat la circa 65°C .