



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00101

(22) Data de depozit: 07.02.2014

(41) Data publicării cererii:  
29.05.2015 BOPI nr. 5/2015

(71) Solicitant:  
• EURO BIO S.R.L., STR. GORUNULUI  
NR. 7, OTOPENI, IF, RO

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

• PAIRAUT ADRIANA LILIANA,  
STR. PETRU RAREȘ NR. 14, VOLUNTARI  
PIPERA, IF, RO;  
• VELEA SANDA, STR. ZAMBILELOR NR.6,  
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,  
B, RO;  
• RĂUT IULIANA,  
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,  
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI FERTILIZANT LICHID  
ORGANIC STABILIZAT, CU ACȚIUNE DE STIMULARE A  
SIMBIOZELOR PLANTELOR DE CULTURĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui fertilizant lichid, cu acțiune de stimulare a simbiozelor plantelor de cultură. Procedeu conform invenției constă în macerarea urzicilor tocate în apă de ploaie, și fermentarea timp de 4...5 zile la o temperatură de 18...20°C, omogenizarea maceratului fermentat de urzică la presiunea de 150 MPa, după care omo-

genizatul este diluat de 5 ori, este supus filtrării și ultrafiltrării microbiologice, prin trecerea pe o membrană filtrantă, din polietersulfonă, cu pori de 0,5 μm, la o rată de 500 l/h și la o diferență de presiune de 0,2 bari, din care rezultă un filtrat cu stabilitate ridicată.

Revendicări: 1



## Procedeu de obținere a unui fertilizant lichid organic stabilizat, cu acțiune de stimulare a simbiozelor plantelor de cultură

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui fertilizant lichid organic, care are o acțiune de stimulare a simbiozelor plantelor de cultură, inclusiv a celor micorizale, obținut prin stabilizarea unui macerat de urzică fermentat.

Sunt cunoscute diferite compozitii de fertilizanți lichizi organici cu acțiune complexă, de nutriție a plantelor de cultură, de protecție a acestora față de agenții patogeni și/sau insecte, și de activare a sistemelor de apărare din țesuturile vegetale. Acești fertilizanți organici lichizi sunt obținuți prin extracția diferitelor tipuri de compost, prin fermentarea maceratelor diferitelor plante, în special urzică, sau prin combinarea extractelor lichide de compost cu macerate fermentate de plante. Fertilizanți lichizi organici astfel rezultați au o acțiune complexă asupra plantelor de cultură, dar prezintă două dezavantaje majore: (i) stabilitate redusă în timp datorită unui conținut ridicat de compuși organici biodegradabili și a unei activități microbiene intense și (ii) riscuri de sănătate publică datorită prezenței bacteriilor enterotoxigene, care pot contamina recolta de fructe și legume proaspete.

Cererea de brevet WO2012054098 A1 descrie un fertilizant lichid organic, care include microorganisme, extracte de plante și un aditiv, cu acizi humici și/sau fulvici, și un procedeu de transport și depozitare pe termen lung a acestuia. Procedeu de depozitare pe termen lung implică menținerea la temperaturi cuprinse între 0 și 6,66°C (32-44°F). Un astfel de procedeu de depozitare pe termen lung este consumator de energie și nu elimină riscurile pentru sănătatea publică determinate de posibila prezență a bacteriilor entero-toxigene.

Brevetul SUA 7833777 propune stocarea fertilizantului organic într-un ambalaj din poliamidă, poliamidă coextrudată și polietilenă de joasă densitate, permeabil la vaporii de apă și la oxigen. Ambalajul menține 5,5 ppm oxigen în mediul lichid, ceea ce permite ca cel puțin 50% din micro-organisme să rămână viabile timp de 12 luni. Soluția propusă menține activitatea biologică a fertilizantului organic lichid, dar nu elimină riscurile de sănătate publică asociate posibilei prezențe a enterotoxigenilor.

Brevetul FR2608014 prezintă utilizarea piritionatului de sodiu (sarea de sodiu a 1-hidroxi-2-piridinetionei) pentru stabilizarea maceratului fermentat de urzică (*Urtica dioica*). Adăosul acestui microbicide cu spectru larg stabilizează produsul pentru utilizare pe termen lung, elimină riscul prezenței bacteriilor entero-toxigene și

potențează acțiunea componentelor din maceratul de urzică față de o serie de organisme dăunătoare – insecte, agenți fitopatogeni, alge care cresc pe scoarța arborilor fructiferi. Prezența unui microbicide cu spectru larg elimină însă acțiunea de stimulare a simbiozelor, micorizale și fixatoare de azot, pe care o exercită maceratul de urzică, reducându-i acțiunea (mediată) de nutriție a plantelor. De asemenea, utilizarea unui microbicide de spectru larg restricționează utilizarea produsului în sistemele de agricultură organică / ecologică (în care nu sunt permise produse de sinteză chimică).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a dezvolta un procedeu de obținere a unui fertilizant lichid pe bază de macerat de urzică, în care stabilizarea să se realizeze fără utilizarea de microbicide de sinteză cu spectru larg și care să elimine riscul prezenței bacteriilor enterotoxigene.

Procedeu conform invenției constă în următoarele etape:

- ✓ Obținerea maceratului fermentat de urzică prin macerarea urzicilor tocate în apă de ploaie, în raport de 1 kg organe aeriene, tulpini și frunze, de urzici tocate la 10 kg apă de ploaie, și fermentarea timp de 4..5 zile la temperatura de 18...20°C;
- ✓ Omogenizarea la înaltă presiune a maceratului fermentat de urzică, prin treceri repetate de 2 ori la presiunea de 150 MPa, printr-un omogenizator cu piston prevăzut cu valvă de tip muchie de cuțit;
- ✓ Diluarea de 5 ori a omogenizatului de macerat de urzică fermentat cu apă de ploaie;
- ✓ Filtrarea prin strat multiplu de tifon pentru reținerea particulelor grosiere de plantă;
- ✓ Ultrafiltrarea microbiologică a maceratului diluat și pre-filtrat, prin trecerea pe o membrană filtrantă din polietersulfonă (PES) cu pori de 0,5 μm, la o rată de 500 litri pe oră și la o diferență de presiune de 0,2 bari.
- ✓ Trecerea aseptică a filtratului steril în recipiente sterile, închiderea aseptică a acestora și menținerea maceratului în locuri ferite de lumină solară directă și temperaturi excesive.

Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Prezintă o stabilitate ridicată în timp datorită ruperii celulelor de microorganisme în etapa de omogenizare la înaltă presiune și a filtrării pe membrane sterilizante;

- Elimină orice bacterie entero-toxigenă eventual prezentă ca urmare a ruperii celulelor de microorganisme în etapa de omogenizare la înaltă presiune și a filtrării pe membrane sterilizante;
- Nu afectează capacitatea maceratului fermentat de urzică de a stimula dezvoltarea simbiozelor plantelor, în special a celor micorizale;
- Eliberează o serie de compuși biologic activi, din microorganismele prezente în maceratul fermentat de urzică, lizate prin șocul de presiune al omogenizării pe valvă de tip muchie de cuțit, care au o acțiune de stimulare a mecanismelor de apărare din plante, sinergică celorlalte componente active din maceratul fermentat de urzică.

Compușii activi din maceratul de urzică fermentat sunt poliaminele, acidul polisilicic, acidul formic, polifenolii / agliconii polifenolici ai flavonoidelor. Poliaminele sunt regulatori de creștere ubicitari pentru plante și microorganisme. Aplicarea exogenă a poliaminelor induce simbioza în legumele inoculate cu *Rhizobium* (Atici *et al.*, 2005, *Symbiosis*, 38(2), 163-174) și stimulează dezvoltarea micorizelor la plante (Wu *et al.*, 2011, *Plant Science*, 21(1), 20-25). Poliaminele exogene stimulează răspunsul plantelor la stresurile biotice (Hussain *et al.*, 2011, *Biotechnology advances*, 29(3), 300-311) și abiotice (Gupta *et al.*, 2013, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(7), 2015-2036). În maceratul fermentat de urzică poliaminele se formează preponderent datorită conținutului inițial foarte ridicat al maceratului de urzică în amine biogene (histamină) și în proteine cu aminoacizi precursori de poliamine (arginină, lizină). Poliaminele sunt compușii care conferă mirosul specific maceratului fermentat de urzică (denumit uzual și purin de urzică, prin asociere cu zeama fermentată scursă din bălegar sau din gunoaie care are același miros specific, determinat de poliaminele cu denumiri sugestive – putresceină, cadaverină).

Acidul polisilicic este o sursă de siliciu cu biodisponibilitate ridicată. Rolul siliciului ca element esențial pentru plante, mai ales în ceea ce privește activarea concomitentă și neantagonistă a diferitelor căi ale sistemului de apărare, a fost recent înțeles (a se vedea trecerea în revistă Van Bockhaven *et al.*, 2013, *Journal of Experimental Botany*, 64(5): 1281-1293). Poliaminele cresc biodisponibilitatea siliciului și acționează sinergic în activarea mecanismelor de rezistență a plantelor la diferitele forme de stres (Khan *et al.*, 2014, *Approaches to Plant Stress and their Management*, Springer, pp 39-52).

Extractele de plante cu conținut ridicat de polifenoli / flavonoizi sunt repelenți pentru afide, datorită acțiunii lor de inhibare a hrănirii (Goławska *et al.*, 2008, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128 (1), 147–153). Țesuturile de urzică (*Urtica dioica*) prezintă nivele ridicate de polifenoli, și în special de acid 5-O-cafeoilchinic, rutină și izo-quercitrină (Orcic *et al.*, 2014, *Food Chemistry*, 143, 48-53), polifenoli cu rezistență crescută la degradarea microbiană. Aplicarea flavonoizilor determină o stimulare formării simbiozelor, inclusiv a celor micorizale (Hassan și Mathesius, 2012, *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3429-3444.).

Distrugerea celulelor microbiene prin omogenizare la înaltă presiune eliberează o serie de componente ale peretelui celular, care reprezintă un tipar molecular asociat microbilor (MAMP - microbe-associated molecular patterns), implicat în activarea sistemelor de apărare din plante (Zhang și Zhou, 2011, *Molecular Plant*, 3 (5), 783-793). Activarea sistemelor de apărare de către MAMP este asociată cu metabolismul poliaminelor (Flury *et al.*, 2013, *Plant Physiology*, 161(4), 2023-2035) și este amorșată de siliciu cu bio-disponibilitate crescută (Van Bockhaven *et al.*, 2013, *Journal of Experimental Botany*, 64(5): 1281-1293). Deci eliberarea de MAMP, cu o acțiune de stimulare a mecanismelor de apărare din plante, din microorganismele prezente în maceratul fermentat de urzică, lizate prin șocul de presiune al omogenizării pe valvă de tip muchie de cuțit, este sinergică celorlalte componente active din maceratul fermentat de urzică.

Prezenta invenție este ilustrată de următorul exemplu.

*Exemplu 1.* Într-un butoi de plastic de 80 litri de introduc 5 kg de frunze și tulpini de urzici (*Urtica dioica*) tocate la dimensiuni mai mici de 0,5 cm. Se adaugă 50 litri de apă de ploaie (sau de apă dedurizată). Se menține timp de 4..5 zile la temperatura de 18...20°C, până la formarea mirosului caracteristic de poliamine. Maceratul fermentat de urzici 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”, cu exprimarea nutrienților citoplasmatici, în special vitamine din grupul B, cofactori metabolici, și a unor componente ale peretelui celular microbial care sunt recunoscute de plante ca tipar molecular asociat microbilor. Maceratul de urzică fermentat omogenizat se diluează în raport de 1 la 5 cu apă de ploaie, iar suspensia diluată se filtrează prin strat multiplu de tifon pentru

reținerea particulelor grosiere de plantă. Se ultrafiltrează maceratul diluat prin trecerea pe un cartus de ultrafiltrare Sartopore® 2 Mini, prevăzut cu o membrană filtrantă din polietersulfonă (PES) cu pori de 0,5 μm, la o rată de 500 litri pe oră și la o diferență de presiune de 0,2 bari. Filtratul steril rezultat se trece aseptice în recipiente sterilizate, care se închid aseptice și se mențin în locuri ferite de lumină solară directă și temperaturi excesive.

În trei șarje din fertilizantul lichid obținut conform procedurii de mai sus s-au determinat principalele ingrediente active: poliamine, prin cromatografie de înaltă presiune, cu detector de fluorescență (Bouchereau *et al.*, 2000. *Journal of Chromatography B*: 747(1), 49-67), acidul polisilicic, prin tehnica colorimetrică robustă descrisă de Kraska și Breitenbeck, 2010, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41(17), 2075-20850, flavonoidele, prin cromatografie de înaltă presiune cuplată cu spectrometrie de masă (Orcic *et al.*, 2014, *Food Chemistry*, 143, 48-53) și MAMPS (ca lipopolizaharid, LPS, conform metodei lui Redwan, 2012, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 42 (2), 171-182).

Rezultatele obținute sunt prezentate în tab. 1 de mai jos. Nivelele ingredientelor active sunt similare cu cele descrise în literatură ca având efectele specifice de stimulare a răspunsului de apărare din plante și de inhibare a hrănirii afidelor.

Tab.1. Conținutul în compușii activi analizați în fertilizantul lichid realizat conform exemplului 1\*.

Ingredient activ	Conținut fertilizant lichid Ex.1
Poliamine (putresceină), μg/l	112,3±14,7
Acid polisilicic, mg/l	153,5±23,4
Flavonoide totale (rutină), mg/l	3,89±0,53
MAMPS (ca LPS), μg/l	23,4±3,7

\*Media a trei șarje

Fertilizantul lichid cf. Ex.1 a fost utilizat pentru a realiza compost micorizat. Ca produs de referință s-a utilizat macerat fermentat de urzică stabilizat prin tindalizare (pasteurizare repetată de trei ori, respectiv încălzirea și menținerea la 72°C timp de 5 min., urmată de răcire, menținere până a doua zi, și re-încălzirea pentru repetarea pasteurizării. Multiplicarea ciupercilor de micoriză biotrofe s-a realizat pe rădăcini de



porumb și fasole. Plantele au fost crescute pe substrat de creștere alcătuit din sol, nisip, vermiculit și rocă fosfatică, în raport 2:1:1:0,1, distribuit în lădițe de lemn căptușite cu folie neagră de polietilenă, perforată pentru a permite drenarea. Fiecare lădiță a fost umplută cu 200 litri de substrat de creștere, care au ocupat circa 80% din volumul disponibil. Au fost însămânțate alternativ boabe de porumb și fasole, la 10 cm unele de altele. Sporii de *Glomus intraradices* MUCL 43204, proveniți din cultură axenică, au fost multiplicați pe rădăcini de *Medicago truncatula*, conform protocolului descris de Chabaud *et al.* 2006, în: Mathesius, U., Journet, E.P. și Sumner, L.W. (eds), The *Medicago truncatula* handbook, <http://www.noble.org/MedicagoHandbook>, ISBN 0-9754303-1-9. Spori de ciuperci de micoriză au fost recuperați din substratul de creștere prin sitare orbitală umedă. Câte 300 spori au fost dezinfectați prin spălări succesive, mai întâi timp de 15 min cu 30 ml soluție de Cloramină T / Tween 20 (1 g Cloramină T și 0,25 ml Tween 20, aduși la 100 ml soluție cu apă distilată), la temperatura camerei, urmată de o spălare cu 30 ml soluție de 200 μg/ml sulfat de streptomicină, sterilizată prin filtrare, timp de 1 oră la 4°C, și în final de 5 clătiri abundente cu apă distilată sterilă.

Experimentul s-a lucrat cu următoarele variante experimentale:

V<sub>1</sub> – martor, substrat de creștere ne-inoculat cu ciuperci de micoriză și netratat cu macerat fermentat de urzică;

V<sub>2</sub> – substrat de creștere inoculat cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, 300 spori per sămânță;

V<sub>3</sub> – substrat de creștere inoculat cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, 300 spori per sămânță și macerat fermentat de urzică tindalizat;

V<sub>4</sub> – substrat de creștere inoculat cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, 300 spori per sămânță și produs conform exemplu 1.

Fiecare variantă a fost realizată în 4 repetiții, fiecare repetiție fiind constituită din câte trei lăzi. Experimentul a fost amplasat randomizat în pătrat latin. Lădițele cu plantele pe care se dezvoltau ciupercile de micoriză au fost menținute în condiții de seră, la 22±2°C în timpul zilei și 17±2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 mcE/m<sup>2</sup>/s, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub 500 mcE/m<sup>2</sup>/s. Plantele au fost crescute timp de 12 săptămâni, fiind fertilizate la interval de două săptămâni, prin aplicarea a câte 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-0-20 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O), preparat din azotat de amoniu și azotat de potasiu, pe fiecare lădiță. De

două ori pe săptămână plantele au fost udate la 80% din capacitatea de reținere a apei în substratul de creștere. După 12 săptămâni plantele au fost tăiate la baza tulpinii și s-a oprit udarea, pentru a stimula producerea de spori de către ciupercile de micoriză. După 10 zile au fost extrase rădăcinile din sol, care au fost tăiate în bucăți de aprox. 1 cm și apoi re-amestecate cu substratul de creștere. Materialul rezultat reprezintă compost micorizat.

În probe din materialele rezultate din fiecare ladă a fost determinat numărul de ciuperci de micoriză (AMF). Numărul de AMF s-a determinat prin numărare directă a sporocarpilor și a sporilor formați în substrat, extrași prin sitare umedă și centrifugare în gradient de densitate de zaharoză (Oehl *et al.* 2003, Appl. Environ. Microbiol. 69: 2816–2824). Determinarea s-a realizat pe 50 g probe substrat de creștere uscat la aer, care a fost sitat umed pe un sistem orbital de sitare (model AS 200, Retsch, Haan, Germania), cu site de 1,000-, 500-, 125-, and 32- $\mu\text{m}$ . Materialul reținut pe sita de 1000- $\mu\text{m}$  a fost verificat pentru sporii adiacenți sistemului radicular, iar cel de pe sita de 500- $\mu\text{m}$  a fost verificat pentru spori de dimensiuni mari, aglomerări de spori sau sporocarpi. Conținutul sitelor 125- and 32- $\mu\text{m}$  a fost depus pe o soluție de 70% apă-zaharoză (masă/volum) și centrifugat la 900 x g pentru 2 min. Supernatantul rezultat a fost re-trecut pe sita 32- $\mu\text{m}$ , spălat cu apă de robinet și transferat în plăci Petri. Sporii, aglomerările de spori și sporocarpii obținuți de pe toate tipurile de site au fost numărați prin folosirea unui microscop de disecție, la o mărire de până la x90. Apoi, de la 50 până la 70% dintre spori au fost montați pe lame cu alcool polivinilic – acid lactic – glicerol (Koske și Tessier, 1983, Mycol. Soc. Am. Newsl. 34:59). Au fost montați numai sporii sănătoși. Spori au fost examinați la un stereomicroscop (SZX10, Olympus, Tokio, Japonia), la o mărire de până la x80. Abundența sporilor a fost determinată pentru fiecare probă și exprimată ca număr de spori AMF per 50 grame de substrat de creștere. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2. Aceste rezultate indică o stimulare a dezvoltării micorizelor și formării de spori pe plantele tratate cu spori de *Glomus intraradices* MUCL 43204, care este semnificativ influențată de tratarea concomitentă cu macerat de urzică, în variantele experimentale în care a fost aplicată și acest bioprodus. Maceratul fermentat de urzică, neprocesat termic, conform exemplu 1, are o activitate de stimulare a formării de micorize superioară maceratului stabilizat termic prin tindalizare.



Tab. 2. Producerea de spori de ciuperci de endomicoriză (AMF), per 50 grame de substrat de creștere, în variantele experimentale realizate\*

Varianta experimentală	Număr spori AMF	% față de varianta inoculată numai cu <i>G. intraradices</i>
V <sub>1</sub> – martor, ne-inoculat cu ciuperci de micoriză sau bacterii	27±7	-
V <sub>2</sub> – inoculat cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204, 300 spori per sămânță	226±24	100%
V <sub>3</sub> –inoculat cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204, 300 spori per sămânță și macerat fermentat de urzică tindalizat;	319±32	141%
V <sub>4</sub> – inoculat cu spori de <i>Glomus intraradices</i> MUCL 43204, 300 spori per sămânță și macerat fermentat de urzică stabilizat conform Ex.1.	376±27	166%

\*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P<0.05.

## Revendicare

1. Procedeu de obținere a unui fertilizant lichid organic stabilizat, cu acțiune de stimulare a simbiozelor plantelor de cultură caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: obținerea unui macerat fermentat de urzică, prin macerarea urzicilor tocate în apă de ploaie, în raport de 1 kg, tulpini și frunze, de urzici tocate, la 10 kg apă de ploaie, și fermentarea timp de 4..5 zile la temperatura de 18...20°C; omogenizarea la înaltă presiune a maceratului fermentat de urzică, prin treceri repetate de 2 ori la presiunea de 150 MPa, printr-un omogenizator cu piston prevăzut cu valvă de tip muchie de cuțit; diluarea de 5 ori a omogenizatului de macerat de urzică fermentat cu apă de ploaie; filtrarea prin strat multiplu de tifon pentru reținerea particulelor grosiere de plantă; ultrafiltrarea microbiologică a maceratului diluat și pre-filtrat, prin trecerea pe o membrană filtrantă din polietersulfonă (PES) cu pori de 0,5 μm, la o rată de 500 litri pe oră și la o diferență de presiune de 0,2 bari; trecerea aseptică a filtratului steril în recipiente sterile, închiderea aseptică a acestora și menținerea maceratului în locuri ferite de lumină solară directă și temperaturi excesive.