



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00947**

(22) Data de depozit: **02/12/2015**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(71) Solicitant:
• **CHEMI CERAMIC F, STR. CIUCULUI
NR. 163, SFÂNTU GHEORGHE, CV, RO**

(72) Inventatori:
• **FAZAKAS JOZSEF,
STR. 1 DECEMBRIE 1918, BL. 18, SC. C,
ET. 4, AP. 12, SFÂNTUL GHEORGHE, CV,
RO;**
• **FAZAKAS ROZALIA-ENIKO,
STR. 1 DECEMBRIE 1918, BL. 18, SC. C,
ET. 4, AP. 12, SFÂNTUL GHEORGHE, CV,
RO;**

• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SESAN TATIANA EUGENIA,
BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU NR. 4,
BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA, STR.PICTOR OCTAV
BÂNCILĂ NR.8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO**

(54) **CERAMICI POROASE CU EFECT BIOSTIMULANT
PENTRU AMORSAREA ECHILIBRATĂ A RĂSPUNSULUI
DE APĂRARE DIN PLANTE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de ceramici poroase pentru aplicare ca ameliorator de sol. Compoziția conform invenției este constituită în procente masice din 40% diatomită, 30% Na₂SiO₃, 25% dioxid de siliciu coloidal și 5% substrat epuizat de ciuperci *Pleurotus*

cultivate și prelucrate prin omogenizare, granulare, uscare și calcinare.

Revendicări: 5



12

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a. 2015 00947
Data depozit 02-12-2015

CERAMICI POROASE CU EFECT BIOSTIMULANT PENTRU AMORSAREA ECHILIBRATĂ A RĂSPUNSULUI DE APĂRARE DIN PLANTE

Prezenta invenție se referă la o compoziție de ceramici poroase, destinată aplicării ca ameliorator de sol, în scopul biostimulării plantelor cultivate pe respectivele soluri, cu o amorsare echilibrată a răspunsului de apărare, urmată de activarea metabolismului secundar și de creșterea producției de fitonutrienți.

Sunt cunoscute diferite tipuri de ceramici poroase destinate utilizării ca ameliorator de sol și/sau substrat de creștere pentru plante. Cererea de brevet US 20150299060 A1 descrie un ameliorator de sol care include particule de ceramici poroase ca material constituent, în care respectivele particule au o umiditate de min 5 % (volum), la o valoare a potențialului matric al solurilor, pF, care se încadrează într-un interval de cel mult 2,7, în întreg volumul de particule din sol. Particulele de ceramică poroasă au un raport de min. 15% reținere de apă, și o conductivitate hidraulică în stare saturată de 0,1 cm/s sau mai mare, și sunt destinate menținerii echilibrului apei în sol și asigurării unui grad de aerare și afânare optim în soluri. Particulele de ceramică sunt obținute din argile, nămol organic și pământ de diatomee.

Cererea de brevet JP 2012110883 A se referă la o compoziție de ameliorator de sol (activator) pe bază de ceramici poroase care conțin acizi humici, destinate utilizării ca agent detoxifiant, pentru absorbția și fixarea compușilor (potențial) toxici (metale grele, radio-nuclizi, reziduuri de pesticide) și pentru creșterea activității microorganismelor din sol. Brevetul SUA 8728460 B2 descrie o compoziție de ceramici poroase, destinată tratării gazonului, terenurilor degradate și solurilor agricole, în care sunt incluse microorganisme benefice plantelor, și care conține argile de tip smectită, perlită, vermiculită, argile de tip Fuller, pământ de diatomee, ca și macronutrienți, micronutrienți, hormoni ai plantelor, acizi humici.

Ceramicile poroase sunt cunoscute și ca ameliorator de sol cu caracteristici de eliberare controlată a nutrienților pentru plante (Fazakas et al. 2007, *Revista Română de Materiale*, 37:205-210), dar până în prezent nu s-au descris compoziții de astfel de ceramici poroase - amelioratori de sol, care să elibereze controlat siliciu cu biodisponibilitate ridicată pentru plante, cu activitate de biostimulant.

Siliciul nu este încă considerat un element esențial pentru plante, ci doar unul cu efecte benefice (Richmond și Sussman, 2003, *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 268-

272), Studiile recente au arătat că siliciul are toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (Savvas și Ntatsi 2015, *Scientia Horticulturae*, 196:66-81). Siliciul solubil este unul dintre puținii elicitori care amorsează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din plante (Van Bockhaven et al. 2013. *Journal of Experimental Botany*, 64:1281-1293). Acțiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în apărarea plantelor față de atacul patogenilor și al dăunătorilor, dar are efecte și de: creștere a eficienței de utilizare a nutrienților; reducere a toxicității metalelor grele; limitare a efectelor stresului hidric (salin, secetă) și a stresului termic - îngheț, temperatură excesivă (Liang et al. 2015, *Silicon in Agriculture*, Springer Netherlands, Dordrecht, 235 pg.).

Siliciul este preluat de către rădăcinile plantelor ca acid ortosilicic, H_4SiO_4 , în concentrații cuprinse între 0,2 și 0,6 mM (Epstein 1999, *Annual Review of Plant Biology*, 50: 641-664). Acidul ortosilicic este un acid foarte slab, cu patru funcțiuni acide, la care valoarea pKa cea mai mică este de 9,8 (Iler, *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, New York, 1979, pg. 207). Aceasta înseamnă că la pH 9,8 acidul ortosilicic este prezent 50% în stare nedisociată și 50% în stare disociată. Intre valorile de pH 2 și 8 acidul ortosilicic este o moleculă neutră, complet nedisociată. La concentrații mai mari de 2 mM începe să polimerizeze, prin reacții de policondensare, cu eliberare de apă (McIntosh, 2012, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14: 996-1013).

În plante siliciul îndeplinește două funcții majore, una structurală și cealaltă fiziologică / biochimică (de biostimulant). Funcția structurală este asociată răspunsului inteligent al apoplastului (Nishitani și Demura 2015, *Plant and Cell Physiology*, 56: 177-179) și implică, în cazul plantelor care acumulează siliciu, și formarea de fitolite cu rol analog unui endo-schelet (Schoelynck et al. 2014, *Journal of Vegetation Science*, 25: 301-313). Această funcție structurală are și un rol de apărare împotriva atacului de boli și dăunători, generând diferite bariere care limitează pătrunderea fitopatogenilor și au un efect repelent asupra dăunătorilor. Funcția fiziologică, implicată în reglarea fină / orchestrarea căilor metabolice specifice răspunsului de apărare din plante, necesită transportul acidului ortosilicic (H_4SiO_4) prin simplast / citoplasmă și implică un sistem cooperat, prezent doar în rădăcini, format din acvaporine (proteine membranare care constituie canale pentru transportul facilitat al apei și al moleculelor mici, neutre / neionizate - nedisociate), din subfamilia NIP-26 (*nodulin-26-like proteins*), denumite și metaloido-porine (Pommerrenig et 2015. *Plant science*, 238:212-22), și proteine de

transport activ / „pompe” moleculare de siliciu, care transferă acidul ortosilicic în xilem (Ma și Yamaji 2015, *Trends in Plant Science*, 20:435-442).

Pentru a furniza siliciu solubil adițional plantelor de cultură se folosesc amendamente ca zgură bogată în siliciu, diatomee, perlită sau săruri de calciu, potasiu sau sodiu ale acidului silicic (Liang et al. 2015, *Silicon Sources for Agriculture*, în *Silicon in Agriculture*, Springer Netherlands, Dordrecht, pg. 225-232). Amendamentele de tip zgură metalurgică au dezavantajul de a se aplica în cantități mari, de ordinul tonelor la hectar, prețul lor de cost redus neputând deseori compensa costurile ridicate de aplicare. Elementele adiționale prezente, ca de ex. Fe sau Al, reduc biodisponibilitatea siliciului. Acidul silicic, parțial mobil în soluția solului, este precipitat ca argile secundare în contact cu ionii imobili Fe^{3+} și Al^{3+} (Sommer et al. 2006, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 310-329).

Perlita și diatomita au dezavantajul unei densități prea mici în comparație cu cea a solului și, din această cauză, se separă la suprafața solului după precipitații sau după irigare.

Sărurile acidului silicic generează prin hidroliză un pH foarte ridicat, acidul silicic fiind un acid foarte slab. pH-ul ridicat al acestor săruri îngreunează aplicarea. De asemenea sărurile acidului ortosilicic sunt eficiente numai pe termen scurt și au dezavantajul de a genera concentrații prea ridicate în soluția solului, dincolo de limita de concentrație la care siliciul solubil este preluat de către rădăcini. Peste această limită se generează și reacții de poli/oligo-condensare, cu formare de specii moleculare de siliciu care nu mai sunt biodisponibile (Spinde et al 2011. *Chemistry of Materials*, 23: 4676-4687). Sunt necesare deci noi produse, care să asigure o eliberare controlată și lentă a siliciului în soluția solului, sub formă de acid silicic, H_4SiO_4 , și la concentrații mai mici de 1 mM.

Cererea de brevet EP 2331484 A1 revendică pulberi de sticlă, cu particule care 90% au dimensiuni mai mici de 200 μm , are un conținut de silice de cel puțin 50% și un conținut de oxid de sodiu de cel puțin 2%, care au capacitatea de a elibera controlat siliciu biodisponibil în mediile de cultură ale plantelor / pentru plante. Pulberea se obține prin măcinarea fină a sticlei necolorate conținând siliciu, în mori de tipul mori cu bile sau mori cu jet, în prezență de abur de înaltă presiune și de înaltă temperatură, urmată de spălarea cu acid clorhidric de min. 2 M, la temperaturi cuprinse între 40 și 80°C și timp de 12 ore. Pulberea eliberează constant mici cantități de acid silicic, dar este însă dificil

de aplicat o pulbere de sticlă, cu dimensiuni micronice, și cu potențial iritant mare pentru operatori.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție de ceramici poroase, de formă granulară, ușor de aplicat pe sol, în cantități reduse, și care eliberează constant cantități mici de acid ortosilicic în soluția solului, cu acțiune de biostimulant pentru plantele cultivate pe solul tratat.

Compoziția, conform invenției, este constituită din: diatomită 40%, Na_2SiO_3 -30%, dioxid de siliciu coloidal – 25% și 5% substrat epuizat de ciuperci *Pleurotus* cultivate pe paie de grâu, amestecată - omogenizată – granulată în mod continuu, uscată la 105°C și calcinată la 960°C.

Diatomita utilizată în compoziția de mai sus este diatomită cu următoarele caracteristici: schelet de silice cu 85-95% SiO_2 , 6% Al_2O_3 , 1% Fe_2O_3 și 0,35 % CaO .

Amestecul de Na_2SiO_3 + sol SiO_2 (1,5:1) este constituit din soluție apoasă de Na_2SiO_3 cu conținut de substanță solidă 33 -35% și dioxid de siliciu coloidal, obținut prin adăugare treptată în porțiuni mici și amestecare continuă a celor două componente.

Dioxidul de siliciu coloidal utilizat pentru obținerea soluției are o suprafață specifică BET cuprinsă între 129 și 155 m^2/g , un conținut de bioxid de siliciu de min. 39,50 % și generează suspensii cu un pH de 5,5.

Compoziția conform invenției eliberează constant concentrații foarte reduse de siliciu în soluția solului, care fiind sub limita de 1 mM sunt preluate de rădăcinile plantelor, determinând, atunci când sunt aplicate în doze echivalente cu 0,2-0,5 kg/m^2 , amorsarea echilibrată a răspunsului de apărare din plantele de grâu și creșterea cu peste 50% a nivelului de compuși biologic activi din plantele de *Passiflora incarnata* și *Momordica charantia*.

Compoziția conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Se aplică sub formă granulară, în cantități relativ mici, care se omogenizează rapid cu solul, fără separare ulterioară;
- ✓ Determină o creștere a capacității de reținere a apei în sol, datorită prezenței dioxidului de siliciu coloidal;
- ✓ Ameliorează gradul de afânare și aerare din sol, datorită porozității ridicate.

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

Exemplul 1. Se amestecă 400 g de diatomită și 50g substrat epuizat de ciuperci Pleurotus cultivat pe paie de grâu cu 550 g amestec Na_2SiO_3 + sol SiO_2 (300g Na_2SiO_3 + 250g sol SiO_2). Componentii solizi (diatomita și substratul de ciuperci) se omogenizează într-un amestecător. Amestecul Na_2SiO_3 + sol SiO_2 se diluează cu 500 ml apă. Amestecul solid omogenizat se încarcă într-un granulator cu taler, care efectuează mișcări de rotație. Soluția apoasă se pulverizează în mod continuu în granulator. Sub efectul umectării materialul începe să se granuleze. Instalația de granulare se oprește, când granulele ajung la 3 – 8 mm. Materialul astfel granulat se usucă la 105 – 110°C, apoi se calcinează la 960°C.

Diatomita utilizată în compoziția de mai sus este diatomită cu următoarele caracteristici: schelet de silice cu 85-95% SiO_2 , 6% Al_2O_3 , 1% Fe_2O_3 și 0,35 % CaO. Densitatea în stare uscată este sub 1 g/cm³ (0,15 — 0,30 g/cm³) culoare albă, alb-albastră sau cenușie.

Amestecul de Na_2SiO_3 + sol SiO_2 (1,5:1) este constituit din soluție apoasă Na_2SiO_3 cu conținut de substanță solidă 33 -35% și dioxid de siliciu coloidal, obținut prin adăugare treptată în porțiuni mici și amestecare continuă. Dioxidul de siliciu coloidal utilizat pentru obținerea soluției are o suprafață specifică BET cuprinsă între 129 și 155 m²/g, un conținut de bioxid de siliciu de min. 39,50 % și generează suspensii cu un pH de 5,5.

Se determină valorile densității, porozității, pH, și capacității de absorbție a apei. Pentru determinarea densității s-a folosit metoda standardizată conform SR EN 772-13: 2001, care implică uscarea materialului până la masă constantă și cântărirea hidrostatică conform EN 772-3. Porozitatea s-a determinat prin metoda descrisă de SR EN ISO 10545-3: 1999. pH a fost stabilit, după imersarea în apă ultrapură (produsă într-un aparat Milli-Q[®] Integral, Merck-Millipore, Darmstadt, Germania), a 1 g de ceramici poroase măcinate la moară cu cuțit bătător până la dimensiuni de 1 -2 mm, prin utilizarea unui electrod de sticlă combinat, legat de un pH-metru (691 Metrohm, Herisau, Elveția).

Valorile obținute sunt: densitate – 1000 kg/m³; porozitate – 70%, pH – 8,2.

Exemplul 2. S-a determinat capacitatea granulelor de ceramici poroase de a elibera acid silicic în soluția solului în amestec cu trei tipuri de sol: preluvosol roșcat molic, București Sud; cernoziom cambic, Fundulea-Călărași; regosol calcaric, Păulești-Prahova. Caracteristicile solurilor utilizate, pentru orizontul 0-15 cm, orizont în care sunt

înglobate de obicei granulele de ceramici poroase după aplicarea tratamentelor de sol, sunt prezentate în tab.1.

Tab.1. Caracteristicile solurilor testate, pentru orizontul 0-15 cm.

Caracteristică	UM	Preluvusol roșcat molic București	Cernoziom cambic Fundulea	Regosol calcaric Păulești
Humus (C x 1,72)	%	2,77	3,3	1,4
Textură	-	Luto-argilos	Agirlo-lutos	Luto-nisipos
pH	Unități pH	6,5	6,3	7,3
Total N	%	0,219	0,179	0,089
Capacitatea de câmp	%	26,7	11,4	11,8
CaCO ₃	%	1,2	0,0	2,9
Capacitatea totală de schimb cationi, CEC	meq/100g	21,75	21,1	21,3
Fosfor total (AL)	ppm	54	28	77
Potasiu mobil	ppm	87	98	140
Densitate aparentă	g/cm ³	1,12	1,15	1,20

Probele de sol prelevate din zonele menționate au fost uscate, sitate prin sită de 1 mm, și omogenizate cu ceramici poroase măcinate și sitate prin sita de 1 mm, în proporții de 0,12%, 0,24 și 0,28%, corespunzând unor doze cuprinse între 0,2 și 0,5 kg.m².

Amestecul de sol cu ceramici poroase a fost distribuit în coloane lizimetre de PVC, de 30 cm lungime și 7,5 cm diametru, prevăzute cu capace. Amestecul a fost menținut în respectivele coloane lizimetre cu granule poroase de polistiren expandat (2-4 mm, Adeplast, Ploiești, România) plasate la baza coloanelor. S-au distribuit câte 1,350 kg în fiecare coloană lizimetru, care s-au umectat la 10% umiditate cu 150 ml apă ultrapură Milli-Q[®]. Coloanele au fost incubate la temperatura camerei (aproximativ 21°C) timp de 56 zile, prelevându-se levigate la 7, 14, 28, 42 și 56 zile. Pentru obținerea levigatelor s-a folosit un volum de 500 ml soluție acid citric 0,01% în apă ultrapură. Folosirea acestei soluții diluate de acid citric are un dublu rol: (i) menținerea pH-ului prin reducerea la minimum a volatilizării și (ii) furnizarea carbonului accesibil necesar menținerii activității microorganismelor (Medina et al. 2014, *Journal of AOAC International*, 97: 643-660). Levigarea coloanelor lizimetru s-a realizat gravitațional, iar

excesul de soluție s-a îndepărtat prin vacuum limitat (-0,5 bari), timp de 2 min. Vacuumarea aceasta limitată este suficientă pentru a permite aerare prin capacele netanșe ale coloanelor lizimetru și menținerea coloanei de sol în condiții aerobe.

Tab.2. Eliberarea siliciului din ceramicile poroase în solurile testate, în coloanele lizimetru, în condițiile experimentale descrise mai sus.

Varianta experimentală	Siliciu în levigate (mM)									
	7		14		28		42		56 zile	
	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}	H ₄ SiO ₄	Si _{tot}
Preluvusul roșcat + 0,12% ceramici conf. Ex. 1	0,25 ±0,02	0,32 ±0,03	0,28 ±0,03	0,33 ±0,02	0,30 ±0,04	0,41 ±0,03	0,32 ±0,03	0,40 ±0,03	0,35 ±0,04	0,44 ±0,05
Preluvusul roșcat + 0,24% ceramici conf. Ex. 1	0,27 ±0,02	0,33 ±0,04	0,29 ±0,04	0,35 ±0,03	0,31 ±0,05	0,43 ±0,03	0,36 ±0,02	0,47 ±0,04	0,36 ±0,04	0,48 ±0,06
Preluvusul roșcat + 0,28% ceramici conf. Ex. 1	0,25 ±0,04	0,33 ±0,02	0,28 ±0,02	0,37 ±0,03	0,32 ±0,03	0,44 ±0,04	0,23 ±0,02	0,45 ±0,03	0,36 ±0,03	0,47 ±0,04
Preluvusul roșcat (martor netratat cu ceramici poroase)	0,18 ±0,02	0,24 ±0,02	0,17 ±0,04	0,25 ±0,02	0,18 ±0,02	0,25 ±0,04	0,18 ±0,03	0,24 ±0,02	0,17 ±0,03	0,24 ±0,03
Cernoziom cambic + 0,12% ceramici conf. Ex. 1	0,32 ±0,05	0,44 ±0,04	0,35 ±0,03	0,47 ±0,03	0,38 ±0,05	0,53 ±0,04	0,40 ±0,05	0,57 ±0,04	0,42 ±0,03	0,55 ±0,05
Cernoziom cambic Fundulea + 0,24% ceramici conf. Ex. 1	0,33 ±0,04	0,45 ±0,03	0,34 ±0,02	0,48 ±0,04	0,38 ±0,03	0,55 ±0,04	0,42 ±0,04	0,59 ±0,05	0,45 ±0,03	0,50 ±0,05
Cernoziom cambic Fundulea + 0,28% ceramici conf. Ex. 1	0,34 ±0,03	0,45 ±0,04	0,38 ±0,03	0,49 ±0,04	0,40 ±0,04	0,57 ±0,02	0,42 ±0,05	0,57 ±0,06	0,46 ±0,02	0,58 ±0,03
Cernoziom cambic Fundulea (martor netratat cu ceramici poroase)	0,20 ±0,03	0,30 ±0,02	0,22 ±0,04	0,32 ±0,04	0,21 ±0,05	0,35 ±0,05	0,23 ±0,03	0,33 ±0,02	0,24 ±0,03	0,35 ±0,02
Regosol calcaric Păulești + 0,12% ceramici conf. Ex. 1	0,28 ±0,03	0,39 ±0,04	0,32 ±0,03	0,41 ±0,03	0,33 ±0,05	0,43 ±0,04	0,35 ±0,05	0,47 ±0,03	0,36 ±0,03	0,45 ±0,03
Regosol calcaric Păulești + 0,24% ceramici conf. Ex. 1	0,29 ±0,04	0,40 ±0,02	0,30 ±0,02	0,43 ±0,04	0,35 ±0,03	0,45 ±0,04	0,37 ±0,04	0,49 ±0,05	0,38 ±0,03	0,50 ±0,05
Regosol calcaric Păulești + 0,28% ceramici conf. Ex. 1	0,29 ±0,03	0,41 ±0,02	0,33 ±0,03	0,44 ±0,04	0,36 ±0,04	0,47 ±0,02	0,38 ±0,05	0,53 ±0,06	0,39 ±0,02	0,51 ±0,03
Regosol calcaric Păulești (martor netratat cu ceramici poroase)	0,23 ±0,03	0,30 ±0,02	0,22 ±0,04	0,32 ±0,04	0,21 ±0,05	0,35 ±0,05	0,21 ±0,03	0,33 ±0,02	0,22 ±0,03	0,35 ±0,02

Levigatele s-a prelevat în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). S-au prelevat probe de câte 1 ml de levigat, care a fost diluat cu 4 ml apă

ultrapură în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber a fost determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Acest test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația absolute de acid silicic a fost calculate după construcția unei curbe de calibrare folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). Domeniul de linearitate a fost stabilit pentru intervalul 0-0,25 mM acid silicic.

S-a lucrat comparative cu coloane lizimetru martor, care au fost umplute numai cu diferitele soluri testate, fără adaos de ceramic. În levigate s-a determinat și siliciu total, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, *Geoderma*, 209: 251-261). Toate probele s-au realizat în trei repetiții. Rezultatele, prezentate în tabelul 2, demonstrează că pentru nici unul din solurile testate nivelul de acid ortosilicic eliberat nu a depășit valoarea de 0,6 mM, uzual preluată de rădăcinile plantelor.

Siliciul biodisponibil eliberat din coloana de sol este rezultatul și al procesului de disociere a acidului silicic absorbit pe coloizii solului, determinat la respectivele concentrații reduse de acidul ortosilicic eliberat în soluția solului (Ronchi et al. 2015, *Catena*, 133: 85-96).

Exemplul 3. A fost determinat efectul tratamentelor la sol cu ceramicile poroase realizate conform Exemplu 1 asupra inducerii enzimelor specifice răspunsului de apărare din plantele de grâu. Plante de grâu (*Triticum aestivum* L. cv. Capo) au fost cultivate în condiții de cameră climatică (Economic Lux, Snijders Labs, Tilburg, Olanda), în tăvi cu 4 kg de cernoziom cambic, Fundulea. Umiditatea în tăvi a fost menținută prin udare zilnică. La varianta experimentală tratată cu ceramici poroase s-au aplicat 2 g/kg sol (0,2%), măcinate la 1 mm și omogenizate cu solul. Martorul nu a fost tratat cu ceramici poroase. După 35 zile au fost prelevate plantele de grâu, în care s-a determinat activitatea enzimelor specifice inducerii răspunsului de apărare pe calea acidului salicilic, SA (peroxidază, EC 1.11.1.7, polifenoloxidaza, EC 1.10.3.1) (Kang și Guo 2014, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 2287-2297) și pe calea acidului jasmonic, JA (lipoxigenază E.C. 1.13.11) (Motallebi et al. 2015, *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 1-11).

Frunzele de grâu au fost mojarate în prezența azotului lichid, La 0,2 g frunze mojarate s-au adăugat 10 ml de tampon fosfat (0,1 mol, pH-ul 6.1) După agitare pentru

o oră la frigider, soluția a fost centrifugată la 13.000 g timp de 15 minute, la 4°C. Supernatantele (extractele enzimaticice) au fost apoi utilizate pentru determinarea activității diferitelor oxidaze, induse diferențiat pe calea SA sau JA. Activitățile peroxidazei, POx, și polifenoloxidazei, PPO, au fost determinate spectrofotometric, prin creșterea densității optice (DO), DO₄₇₀ și, respectiv, DO₄₂₀. Substraturile utilizate pentru POx și PPO au fost guaiacol / H₂O₂, și respectiv, catecol. 0,3 ml de extract s-au adăugat peste 1,7 ml de substrat 1 mM în tampon 0,1 M Tris-HCl, pH 7.8. (Gomes et al. 2005, *Scientia Agricola*, 62: 547-551). Activitatea LOx a fost măsurată la 234 nm. Soluția de substrat care conținea acid linoleic (Sigma, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, SUA) a fost pregătită conform metodei Bohland et al. 1997 (*Plant Physiology*, 114: 679-685), purtată cu azot și stocată la -20°C, în părți alicote. Pentru determinarea activității LOx s-au diluat 60 μl de extract la 1 ml de tampon fosfat-citrat 0,1 M, pH 6.2, s-a adăugat 0,1 ml de soluție substrat, și s-a incubat timp de 15 min la 30°C.

Citirile pentru determinarea activității POx și PPO au fost efectuate în modul dinamic, în fiecare secundă, timp de 2 minute pe un spectrofotometru UV-VIS Cintra 202 (GBC Scientific Instrument, Dandenong, Australia). Activitățile enzimaticice au fost exprimate în unități per gram de substanță proaspătă (U/g). O unitate enzimatică POx și PPO a fost definită ca fiind acea cantitate de enzimă care determină o creștere de 0.1 unități DO per minut per ml de extract. O unitate enzimatică LOx este acea cantitate de enzimă care determină o creștere a absorbantei cu 0,001 unități per minut per ml de extract. Martorii de reactivi utilizați ca referință pentru citirile spectrofotometrice au fost tampoanele de extracție și de reacție. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tab. 3. Activitatea enzimelor specifice inducerii răspunsului de apărare pe calea acidului salicilic (peroxidază, POx, polifenoloxidaza, PPO) și pe calea acidului jasmonic (lipoxigenază LOx) în plantele de grâu.

Varianta experimentală	Activitatea POx (U/g substanță proaspătă)	Activitatea PPO (U/g substanță proaspătă)	Activitatea LOx (U/g substanță proaspătă)
Martor, crescut pe sol netratat cu ceramici poroase	132 ± 17b	142 ± 28b	15 ± 3b
Sol tratat cu ceramici poroase conf. Ex.1, 0,2%	271 ± 28a	252 ± 24a	25 ± 4a

Rezultatele obținute demonstrează o inducere echilibrată a răspunsului de apărare din plantele de grâu, sub acțiunea tratamentului la sol cu ceramici poroase realizate conform Exemplu 1.

Exemplu 4. S-a testat efectul tratamentelor cu granule de ceramici poroase aplicate ca tratament la sol, în doză de 200 g per m² (două aplicări a câte 100 g, la interval de 3 săptămâni) asupra acumulării compușilor biologic activi în plantele nutraceutice *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L. Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, fertilizat echilibrat conform recomandărilor agrochimice. Tratamentele la sol s-au aplicat în a doua decadă a lunii mai 2015 și la începutul lunii iulie 2015, când plantele erau la începutul înfloritului, și, respectiv, la sfârșitul perioadei de înflorit. După fiecare tratament s-au recoltat plantele pentru a fi analizate din punct de vedere al conținutului de compuși activi.

Materialul vegetal (frunze *P. incarnata*, fructe *M. charantia*) a fost uscat la 50°C și apoi a fost extras în etanol 70% (v/v), într-un raport de 1,5:10 (m/v), la temperatura camerei, timp de 10 zile. Extractele au fost filtrate, iar filtratele au fost stocate la 4°C până la utilizare. Greutatea în stare uscată a fost determinată folosind un analizator de umiditate (Radwag, Radom, Polonia). In extractul din materialul vegetal de *P. incarnata* s-a determinat activitatea antioxidantă, prin măsurarea capacității respectivei extracte de stinge: cationii radicalici produși de acidul 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulphonic (ABTS) și radicalii stabili generați de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Rezultatele au fost exprimate ca echivalent Trolox (TEAC) / g s.u. și, respectiv, ca % inhibarea DDPH (Gaspar et al. 2014, *Romanian Biotechnological Letters*, 19: 9353-9365).

Tab. 4. Activitatea antioxidantă în extractul de material vegetal provenit din plante de *Passiflora incarnata*.

Varianta experimentală	TEAC / g s.u.		%DDPH	
	Primul tratament	Al doilea tratament	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor, crescut pe sol netratat cu ceramici poroase	78,55 ± 3,05b	78,69 ± 5,88b	28,83 ± 1,22a	28,33 ± 1,56b
Sol tratat cu ceramici poroase conf. Ex.1, 200 g per m ² , două aplicări a câte 100 g, la interval de 3 săptămâni	93,05 ± 1,53a	135,32 ± 13,28a	30,26 ± 2,13a	45,60 ± 1,96a

Rezultatele prezentate în tab. 4. demonstrează că aplicarea la sol a granulelor de ceramice poroase conform Exemplu 1, în doză de 0,2 kg per m², determină o creștere a activității antioxidante de peste 50% în frunzele de *P. incarnata*. Activitatea antioxidantă este în directă legătură cu utilizările fitoterapeutice ale plantelor de *Passiflora* (Sarris et al. 2013, CNS Drugs, 27: 301-319).

În extractul de material vegetal de *M. charantia* s-a determinat activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, o proteină transmembranară majoră, cu rol în diabetul de tip II, non-insulino-dependent, care este inhibată de sapogenine triperenice de tip cucurbitan din *M. charantia*. (Zeng et al. 2014. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81: 176-180). S-a folosit metoda descrisă de Lund et al. 2004 (*Journal of Biological Chemistry*, 279:, 24226-24235), folosind ca substrat pNPP (para-nitro-fenil fosfat). Tamponul de testare (pH 7,4) a fost constituit din 50 mM 3,3-dimetilglutarate, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitol a fost ajustat la o tărie ionică de 0.15 M prin adăugarea de NaCl. S-a lucrat în placă de microtitrare cu 96 godeuri, din polipropilenă volum de lucru 250 μl (Nunc™ 96-Well Polypropylene MicroWell™ Plates, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Concentrațiile corespunzătoare de extracte (0 și 30 μl) au fost adăugate la tamponul de testare conținând 0 sau 2,5 mM pNPP (concentrație finală) în volum total de 200 μl. Reacția a fost inițiată de adăugarea de 20 μl, conținând 10 unități protein-tirozinfosfatază (PTP1B, Prospec, Rehovot, Israel). S-a incubat timp de 30 min la temperatura de 37°C. Reacția a fost stopată prin adăugarea a 30 μl de soluție 0.5 M NaOH. S-a măsurat absorbanta în placa de microtitrare la 405 nm folosind un cititor de plăci (FluoroStar Omega, BMG LabTech, Offenburg, Germania) cu posibilitatea corecției absorbantei cauzate de substrat în absența enzimei și compuși. Ca martor pozitiv, activitatea de PTP1B a fost determinată în prezența vanadatului de sodiu, Na₃VO₄, un inhibitor cunoscut al activității protein-tirozinfosfatazei 1B. Rezultatele s-au exprimat ca % de inhibare și sunt prezentate în tabelul 5.

Tab. 5. Activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, PTP1B, în extractele din materialul vegetal provenit din plante de *Momordica charantia*.

Varianta experimentală	% inhibare PTP1B	
	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor, crescut pe sol netratat cu ceramici poroase	27,25 ± 7,08b	28,92 ± 8,74b

Sol tratat cu ceramici poroase conf. Ex.1, 200 g per m ² , două aplicări a câte 100 g, la interval de 3 săptămâni	53,47 ± 2,63a	62,24 ± 5,84a
--	------------------	------------------

Rezultatele demonstrează că aplicarea la sol a granulelor de ceramice poroase conform Ex.1, în doză de 0,2 kg per m², determină o creștere a activității de inhibare a enzimei implicate în diabetul de tip II, protein-tirozinfosfatazei 1B, cu peste 50% în fructele de *Momordica charantia*.

Compoziția realizată conform Exemplu 1, aplicată în doze echivalente cu 0,2-0,5 kg/m², eliberează constant în soluția solului concentrații foarte reduse de siliciu, sub formă de acid ortosilicic, H₄SiO₄. Acidul ortosilicic, fiind sub limita de 1 mM, este preluat permanent de rădăcinile plantelor și translocat prin simplast. În simplast acidul ortosilicic determină amorsarea echilibrată a sistemului de apărare din plante, cu activarea concomitentă a celor două principale căi ale răspunsului de apărare, calea acidului salicilic și calea acidului jasmonic în plantele de grâu. Activarea echilibrată a răspunsului de apărare este însoțită de activarea metabolismului secundar. La plantele de *Passiflora incarnata* și *Momordica charantia* cultivate pe soluri tratate cu aceste ceramici poroase activarea metabolismului secundar indusă de siliciu determină o creștere cu peste 50% a nivelului de compuși biologic activi din țesuturile vegetale.

Revendicări

1. Ceramici poroase cu efect biostimulant pentru amorsarea echilibrată a răspunsului de apărare din plante conform invenției caracterizate prin aceea că este constituită din: diatomită 40%, Na_2SiO_3 -30%, dioxid de siliciu coloidal – 25% și 5% substrat epuizat de ciuperci *Pleurotus* cultivat pe paie de grâu, amestecată - omogenizată – granulată în mod continuu, uscată la 104°C și calcinată la 960°C.
2. Ceramici poroase cu efect biostimulant pentru amorsarea echilibrată a răspunsului de apărare din plante conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că diatomita utilizată în compoziția de mai sus este diatomită cu următoarele caracteristici: schelet de silice cu 85-95% SiO_2 , 6% Al_2O_3 , 1% Fe_2O_3 și 0,35 % CaO .
3. Ceramici poroase cu efect biostimulant pentru amorsarea echilibrată a răspunsului de apărare din plante conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că amestecul de Na_2SiO_3 + sol SiO_2 (1,5:1) este constituit din soluție apoasă de Na_2SiO_3 cu conținut de substanță solidă 33 -35% și dioxid de siliciu coloidal, obținut prin adăugare treptată în porțiuni mici și amestecare continuă a celor două componente.
4. Ceramici poroase cu efect biostimulant pentru amorsarea echilibrată a răspunsului de apărare din plante conform revendicării 1 caracterizate prin aceea că dioxidul de siliciu coloidal utilizat pentru obținerea soluției are o suprafață specifică BET cuprinsă între 129 și 155 m^2/g , un conținut de bioxid de siliciu de min. 39,50 % și generează suspensii cu un pH de 5,5.
5. Ceramici poroase cu efect biostimulant pentru amorsarea echilibrată a răspunsului de apărare din plante conform revendicării 1 caracterizate prin aceea că eliberează constant concentrații foarte reduse de siliciu în soluția solului, care fiind sub limita de 1 mM sunt preluate de rădăcinile plantelor, determinând, atunci când sunt aplicate în doze echivalente cu 0,2-0,5 kg/m^2 , amorsarea echilibrată a răspunsului de apărare din plantele de grâu și creșterea cu peste 50% a nivelului de compuși biologic activi din plantele de *Passiflora incarnata* și *Momordica charantia*.