



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00945

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

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

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

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

• VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;
• POPESCU MARIANA, STR. VALEA ROȘIE
NR. 6, BL. 62, SC. C, ET. 1, AP. 35,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR PELETE BIOACTIVE CU
MICROORGANISME DIN SUBSTRAT EPUIZAT DE CULTURA
CIUPERCILOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor pelete bioactivate cu microorganisme din substrat epuizat de la cultura ciupercilor utilizate pentru tratamentul solului. Procedeu conform invenției constă în cultivarea axenică pe medii minimale lichide care includ 2% diatomită și aerări de maximum 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C timp de 3...5 zile, recoltarea și uscarea biomasei de microorganisme și a

diatomitei, omogenizarea a 9...11 părți biomasă cu 1,5...2,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,2...2,4 părți lecitină, 84,3...87,1 părți substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat și măcinat, compactarea amestecului în presă de peleți, din care se formează peleți cu o lungime de aproximativ 15 mm și un diametru de 5...8 mm.

Revendicări: 3



PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR PELETE BIOACTIVATE CU MICROORGANISME DIN SUBSTRAT EPUIZAT DE CULTURA CIUPERCILOR

Prezenta invenție se referă la obținerea unor pelete, bioactivate cu microorganisme, din substrat epuizat de la cultura ciupercilor lignocelulozite, destinate tratamentului solului și/sau resturilor vegetale care acoperă solul, în cazul sistemelor de agricultură conservativă.

Sunt cunoscute utilizări ale substratului epuizat de la cultura ciupercilor în tehnologiile de cultura plantelor, în special pentru ameliorarea caracteristicilor solului / substratelor de cultură. Sistemele enzimatic implicate în degradarea lignocelulozei, laccaze, xilanaze, lignin-peroxidaze, celulaze și hemicelulaze, prezente în cantități mari în substratul epuizat de la cultura ciupercilor lignocelulozite, au efecte de accelerare a formării humusului și de degradare a unor contaminanți de tipul hidrocarburilor aromatice sau reziduurilor de pesticide (Phan și Sabaratnam, 2012, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 863-873). Chitina din substratul epuizat determină o creștere a activității microorganismelor chitinolitice din sol, cu suprimarea bolilor plantelor (Parada et al. 2012, *Journal of Phytopathology*, 160: 390-396). Chitosanul format prin deacetilarea chitinei are efecte de biostimulant de creștere, cu activarea sistemelor de rezistență și stimularea creșterii plantelor (Kwak et al. 2015, *Mycobiology*, 43: 311-318). Substratul epuizat de la cultura ciupercilor a fost folosit și pentru producerea de biopreparate de uz agricol, prin cultivare în regim de fermentație (semi)solidă a tulpinilor entomopatogene de *Bacillus thuringiensis* (Wu, et al. 2014, *Journal of Economic Entomology*, 107: 137-143); antagoniste de *Trichoderma viride* (Brevet RO126363 B1, cu formarea de composturi / soluri supresive pentru fungii micotoxigeni din grupul *Fusarium graminearum*), solubilizatoare de fosfor *Pichia farinose* (Zhu et al. 2012, *Bioresource Technology*, 111: 410-416).

O problemă tehnică asociată utilizării substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor lignocelulozice pentru tratamentul solului este determinată de dificultatea distribuirii uniforme a unui material înalt heterogen (paie parțial degradate, înglobate randomizat în miceliu de ciuperci) pe suprafața solului. O soluție tehnică la această problemă este compactarea prin diferite tehnici (peletizare, tabletare, brichetare) pentru a genera produse ușor de administrat la

sol (sau pe resturile vegetale, care acoperă solul în sistemele de agricultură conservativă). Conținutul ridicat de proteine și chitină din substratul epuizat determină o aderență ridicată la matrițele utilizate pentru compactare, generând blocări ale echipamentelor utilizate și riscuri de rupere a componentelor cinematice implicate în transferul forțelor de comprimare.

Un alt dezavantaj al utilizării substratului epuizat de la cultura ciupercilor lignocelulozice ca tratament la sol este determinat de variabilitatea ridicată a rezultatelor finale, care depinde în mod semnificativ de microflora specifică fiecărui sol. Pentru a crește reproductibilitatea rezultatelor aplicării substratului epuizat de ciuperci lignocelulozice ca tratament la sol în cadrul tehnologiilor agricole (sau ca tratament al resturilor vegetale în cadrul tehnologiilor de agricultură conservative) o soluție este bioactivarea cu tulpini de microorganisme benefice plantelor de cultură (inclusiv microorganisme biostimulante), cu competență saprofită recunoscută.

Sunt cunoscute diferite procedee de condiționare sub formă de produse compactate a microorganismelor benefice plantelor. Cererea de brevet WO2009093261 A2 se referă la un biopesticid, realizat pe baza uneia sau a mai multor ciuperci microscopice entomopatogene, care se prezintă sub formă unor tablete puternic comprimate. Ciupercile entomopatogene sunt selectate din grupul reprezentat de genurile *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Verticillium* și *Nomuraea*, iar tabletele conțin conidiile unuia sau mai multor ciuperci microscopice entomopatogene, protectanți UV, agenți anti-saprofitici, desiccanți, lubricanți, agenți de legare, dezintegranți și diluanți.

Brevetul EP0929215 B1 revendică utilizarea masei de reziduu celular, rămasă după extragerea din boabele de soia a uleiului și a proteinelor, ca bio-purtător pentru realizarea unor tablete efervescente cu microorganisme utile (exemplificat prin *Lagenidium*, o oomicetă entomopatogenă). Una din compozițiile de realizare a brevetului este constituită din 60 părți masă de reziduu celular de soia, 30 părți (biomasă de) *Lagenidium*, 5 părți pirofosfat acid de sodiu, 5 părți bicarbonat de sodiu. Biomasă de *Lagenidium* este încorporată în materialul bio-purtător (masă de reziduu celular de soia), uscată, amestecată cu sistemul efervescent pirofosfat / bicarbonat și apoi tabletată

Brevetul SUA 8940074 B2 descrie un procedeu de fabricare a biofertilizanților sub formă de pelete care include următoarele etape: amestecarea

unui material biodegradabil și un material polimeric solubil în apă pentru a forma un prim amestec; amestecarea unui poliol cu apă și cu nutrienți salini pentru a forma un al doilea amestec; amestecarea primului amestec și celui de al doilea amestec pentru a forma un conglomerat granular, care reprezintă cel de al treilea amestec; pulverizare unor endo-spori de bacterii benefice pe granulele celui de-al treilea amestec pentru a forma granule de biofertilizant; extrudarea granulelor de bio-fertilizant pentru a forma pelete compacte.

Dezavantajul comun al procedeelelor de condiționare prin compactare este dat de rata de supraviețuire redusă a microorganismelor supuse condiționării prin aceste procedee de compactare, care implică pentru microorganisme atât stresul uscării, cât și cel al comprimării.

Aplicarea în mediu de condiționare a microorganismelor a unor compoziții stabilizante crește rata de supraviețuire, dar nu într-o măsură suficientă. Sunt necesare procedee prin care să se stimuleze sistemele interne de protecție ale microorganismelor, pentru a crește rezistența lor intrinsecă la condiționarea ulterioară sub formă de pelete compacte, în care microorganismele sunt supuse atât stresului uscării, cât și a celui rezultat din comprimarea cu forțe mari.

Autorii au stabilit că acidul ortosilicic, cunoscut ca fiind un biostimulant care crește rezistența plantelor la stresurile biotice și abiotice (Savvas și Ntatsi, 2015 *Scientia Horticulturae*, 19: 66–81) și ca având un efect de stimulare a creșterii microorganismelor (Wainwright et al. 1997, *Mycological Research*, 101: 933-938), are și un efect de stimulare a sistemelor interne de protecție a microorganismelor față de factorii adversi de mediu.

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). Datorită acestei tendințe de policondensare acidul ortosilicic nu poate fi inclus în mediile de cultură ale microorganismelor în concentrații mari, ci trebuie să fie eliberat constant în concentrații mici, biologic active, din compuși precursori. Biomasa rezultată trebuie să fie apoi ușor de

condiționat în formule de tablete efervescentă, cu asigurarea unei supraviețuiri ridicate a microorganismelor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu, ușor de realizat, de obținerea unor pelete din substrat epuizat de la cultura ciupercilor lignocelulozice, bioactivate cu microorganisme benefice plantelor, în special microorganisme cu activitate de biostimulare a plantelor de cultură, prin care să se asigure o rată ridicată de supraviețuire a microorganismelor și o producere a peletelor.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu de obținere a biomasei de microorganismelor cu rezistență mare la condiționare prin comprimare în structuri efervescente, prin cultivarea pe medii în care sunt eliberate constant concentrații mici, active biologic, de acid ortosilicic.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Cultivarea axenică pe medii minimale lichide, care includ 2% diatomită, la pH optim și la aerări de până la 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C, timp de 3-5 zile;
- Recoltarea biomasei de microorganisme și a diatomitei prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar;
- Uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei, recoltate prin filtrare, până la max. 5% umiditate reziduală;
- Omogenizarea a 9-11 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 1,5-2,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,2-2,4 părți lecitină, 84,3-87,1 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă;
- Compactarea amestecului biomasă microorganism – diatomită – lignosulfonat de sodiu – lecitină – substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, prin presare într-o presă de peleți cu matrice orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5...8 mm;

Procedeul favorizează eliberarea controlată, în etapa de cultivare axenică pe medii minimale lichide, de acid ortosilicic în concentrații care sunt sub 1 mM.

Uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei se face prin pulverizarea unei suspensii normalizate la 10% substanță uscată, în condiții

blânde, la 130-140°C temperatură de intrare și 75-80°C temperatură de ieșire, atunci când microorganismele cultivate sunt bacterii gram pozitive, care formează endo-spori sau ciuperci microscopice care formează conidii, și prin liofilizare, prin creșterea graduală a temperaturii de la -25°C la 25°C, la 0,9 mbar presiune, timp de 48 ore, atunci când microorganismele sunt bacterii gram-negative.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- Asigură eliberarea constantă a unor concentrații mici, biologic active, de acid ortosilicic din diatomită, datorită cultivării microorganismelor pe mediu minimal, care stimulează producerea de către microorganisme a biocompușilor implicați în solubilizarea acidului ortosilicic;
- Determină o rată de supraviețuire avansată a microorganismelor, care sunt cultivate în condiții care să favorizeze exprimarea mecanismelor interne de rezistență la factorii externi, datorită efectului protector al acidului silicic, combinat cu șocurile de temperatură;
- Reduce în mod semnificativ aderența substratului epuizat la matrița de peletizare datorită efectului lubrifiant combinat al lignosulfonatului și al lecitinei.

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

Exemplu 1. Într-un bioreactor (Biostat® B, Goettingen, Germania), prevăzut cu senzor de pH și senzor de oxigen dizolvat (DO) (InPro6800; Mettler-Toledo AG, Greifensee, Elveția), și cu un vas de 5 litri, se aduc 2 litri mediu minimal M9 care conține la 1 litru: Na₂HPO₄ (anhidru) 6 g; KH₂PO₄ 3 g; NaCl 0.5 g; NH₄Cl 1 g, 10 g lactoză. Se suspendă în mediul rezultat 40 g de diatomită, un conținut de bioxid de siliciu de min. 91,5%. Mediul rezultat se sterilizează prin autoclavare *in-situ*, și apoi se adaugă nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,1 mM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 3x10⁻⁹ M; H₃BO₃ 4x10⁻⁷ M; CoCl₂ · 6 H₂O 3x10⁻⁸ M; CuSO₄·5H₂O 1x10⁻⁸ M; MnCl₂·4H₂O 8x10⁻⁸ M; ZnSO₄·7H₂O 1x10⁻⁸ M; FeSO₄·7H₂O 1x10⁻⁶ M, rezultate din soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare. Se verifică pH-ul și se aduce la pH 5,5 cu HCl 1 M sau NaOH 1 M.

Toți reactivi folosiți sunt proveniți de la Merck-Millipore, Darmstadt, Germania, cu excepția dioxidului de siliciu coloidal, care este (Celite® 545, Imerys Filtration Minerals, San Jose, CA, SUA). Orice alți reactivi care au aceleași caracteristici tehnice pot fi utilizați.

Mediul se inoculează cu 100 ml de suspensie de conidii de *Trichoderma asperellum* Td36b, NCAIM P(F) 001434, normalizate la 10^8 propagule per ml prin numărare la lamela citometrică. Tulpina *T. asperellum* Td36b este cunoscută ca având efect de biostimulare a plantelor de cultură (Raut et al. 2015. Journal of Biotechnology, 208, S62). Se cultivă tulpina Td36b timp de 5 zile, la o rată de aerare de până la 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C.

Din oră în oră se prelevează aseptice probe de 2- 2,4 ml mediu de cultură cu microorganisme, în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Se separă prin centrifugare supernatantul, de sedimentul microbial și de gelul de silice, și se preiau probe de câte 1 ml de supernatant, care este diluat cu 4 ml apă ultrapură, în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber este 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 absolută de acid silicic este calculată după construcția unei curbe de calibrare, folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). În mediu de cultură se determină o concentrație de acid ortosilicic care este permanent de sub 1 mM, fiind consecința a două procese concomitente – solubilizarea siliciului sub efectul metabolismului microbial și asimilarea acidului ortosilicic. În sedimentul de microorganisme, separat de diatomee și spălat, se determină siliciul total, după mineralizare, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, Geoderma, 209: 251-261). Se constată o continuă creștere a conținutului de siliciu în biomasa de microorganisme, creștere care dovedește asimilarea acidului ortosilicic de către microorganisme.

După terminarea perioadei de cultivare se recoltează biomasa de microorganisme și diatomite prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar, folosind o unitate Sartolab® (Sartorius, Goettingen, Germania). Suspensia rezultat prin filtrare este resuspendată în apă pură milliQ (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-Millipore) până la 5% substanță uscată. Suspensia rezultată se usucă până la max. 5% umiditate reziduală, pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 130-140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de

75...80°C. O instalație de uscare prin pulverizare care poate fi utilizată în acest scop este de exemplu Niro Production Minor Unit, produsă de Niro Gea (Soeborg, Danemarca) sau Laboratory spray dryer, produsă de ICF Cibec (Maranello, Italia). Orice alt tip de instalație de uscare prin pulverizare, cu caracteristici tehnice similare, poate fi utilizată.

Se iau 10 părți biomasă de microorganisme și siliciu coloidal uscate, care se aduc într-un amestecător în pat fluidizat (MiniGlatt, Glatt, Binzen, Germania), împreună cu 9 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 1,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,4 părți lecitină, 87,1 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Lignosulfonatul de sodiu folosit este Borresperse NA (Borregarrd, Sarspborg, Norvegia), cu următoarele caracteristici: substanță uscată min. 93%; calciu max. 0,6%, pH (soluție 10%) 8,3±0,8, dar orice alt lignosulfonat cu caracteristicile de mai sus poate fi utilizat.

Lecitina folosită este Thermolec[®] WFC, Archer Daniels Midland (Decatur, IL, SUA), cu o balanță hidrofil-lipofilă mai mare de 8, dar orice altă lecitină modificată cu caracteristicile de mai sus poate fi utilizată.

Amestecul rezultat prin omogenizare în pat fluidizat se peletizează 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 ...0,02 m², 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.

Orice altă presă orizontală de peletizat, care asigură condiții similare de densificare prin presare poate fi utilizată.

Peleții rezultați sunt stabili, cu o rezistență la rupere de circa 4 kP.

La sfârșitul procedurii de obținere se analizează conținutul de propagule de *Trichoderma* prin cultivare pe medii selective. Acest conținut este de minim 5x10⁷ ufc/g, și nu scade cu mai mult de 10% prin stocarea peletilor bioactivați, la temperatura camerei timp de 6 luni.

Exemplu 2. Se procedează ca în Exemplu 1, cu următoarele diferențe. Se folosește glucoză ca sursă de carbon și energie în mediul minimal, se utilizează tulpina *Brevibacillus parabrevis* B50, NCAIM (P) B 001413 (tulpină cunoscută ca fiind biostimulantă pentru plante (cerere de brevet RO RO128931), cultivarea se

realizează timp de trei zile, iar etapa de omogenizare a biomasei de microorganisme și a diatomitei uscate se realizează în următoarele proporții: cu 10 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 2 părți lignosulfonat de sodiu, 2,3 părți lecitină, 85,7 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Peleții rezultați sunt stabilă, cu o rezistență la rupere de circa 4 kP.

La sfârșitul procedurii de obținere se analizează conținutul de propagule de *Brevibacillus* prin cultivare pe medii selective. Acest conținut este de minim 10^8 ufc/g, și nu scade cu mai mult de 10% prin stocarea tabletelor la temperatura camerei timp de 6 luni.

Exemplu 3. Se procedează ca în Exemplu 1, cu următoarele diferențe. Se folosește glucoză ca sursă de carbon și energie în mediul minimal. Se utilizează tulpina *Pseudoxanthomonas mexicana* P32, NCAIM (P) B 001414, (cunoscută ca fiind biostimulantă pentru plante, brevet EP2738267 B1), iar cultivarea se realizează timp de 3 zile. Uscarea se face prin liofilizare, pe un liofilizator Christ Alpha 1-2 LD (Martin Chist, Osterode am Harz, Germania), prin creșterea graduală a temperaturii de la -25°C la 25°C , la 0,9 mbar presiune, timp de 48 ore.

Etapa de omogenizare a biomasei de microorganisme și a diatomitei uscate se realizează în următoarele proporții: cu 11 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 2,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,2 părți lecitină, 84,3 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Peleții rezultați sunt stabilă, cu o rezistență la rupere de circa 4 kP.

La sfârșitul procedurii de obținere se analizează conținutul de propagule de *Pseudoxanthomonas* prin cultivare pe medii selective. Acest conținut este de minim 5×10^7 ufc/g, și nu scade cu mai mult de 10% prin stocarea tabletelor la temperatura camerei timp de 6 luni.

Această lucrare a fost realizată prin programul Parteneriate in domenii prioritare — PN II, derulat cu sprijinul MEN – UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0846, contract 159/2014 CERES.

REVENDICARI

1. Procedeu de obținere a unor pelete bioactivate cu microorganisme din substrat epuizat de cultura ciupercilor, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: cultivarea axenică pe medii minimale lichide, care includ 2% diatomită, la pH optim și la aerări de până la 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C, timp de 3-5 zile; recoltarea biomasei de microorganisme și a diatomitei prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar; uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei, recoltate prin filtrare, până la max. 5% umiditate reziduală; omogenizarea a 9-11 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 1,5-2,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,2-2,4 părți lecitină, 84,3-87,1 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă; compactarea amestecului biomasă microorganism – diatomită – lignosulfonat de sodiu – lecitină – substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, 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.
2. Procedeu de obținere a unor pelete bioactivate cu microorganisme din substrat epuizat de cultura ciupercilor, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** favorizează eliberarea controlată, în etapa de cultivare axenică pe medii minimale lichide, de acid ortosilicic în concentrații care sunt sub 1 mM.
3. Procedeu de obținere a unor pelete bioactivate cu microorganisme din substrat epuizat de cultura ciupercilor, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei se face prin pulverizarea unei suspensii normalizate la 10% substanță uscată, în condiții blânde, la 130-140°C temperatură de intrare și 75-80°C temperatură de ieșire, atunci când microorganismele cultivate sunt bacterii gram pozitive, care formează endo-spori sau ciuperci microscopice care formează conidii, și prin liofilizare, prin creșterea graduală a temperaturii de la -25°C la 25°C, la 0,9 mbar presiune, timp de 48 ore, atunci când microorganismele sunt bacterii gram-negative.