



(11) **RO 131931 B1**

(51) Int.Cl.
A01N 63/02 (2006.01),
C12N 1/00 (2006.01),
A01P 21/00 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00945**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/01/2020** BOPI nr. **1/2020**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 2013/0324407 A1; CA 2860848 A1;
RO 122588 B1; J. R. RAO ET. ALL.,
"PELLETED ORGANO-MINERAL
FERTILISERS FROM COMPOSTED PIG
SLURRY SOLIDS, ANIMAL WASTES AND
SPENT MUSHROOM COMPOST FOR
AMENITY GRASSLANDS", WASTE
MANAGEMENT, VOL. 27,
PP. 1117-1128, 2007**

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



RO 131931 B1

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

5 Sunt cunoscute utilizări ale substratului epuizat de la cultura ciupercilor în tehnologiile
de cultura plantelor, în special pentru ameliorarea caracteristicilor solului/substraturilor de
6 cultură. Sistemele enzimatic implicate în degradarea lignocelulozei, laccaze, xilanaze,
7 lignin-peroxidaze, celulaze și hemicelulaze, prezente în cantități mari în substratul epuizat
de la cultura ciupercilor lignocelulozitice, au efecte de accelerare a formării humusului și de
9 degradare a unor contaminanți de tipul hidrocarburilor aromatice sau reziduurilor de pesticide
(Phan și Sabaratnam, 2012, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 96: 863-873).
11 Chitina din substratul epuizat determină o creștere a activității microorganismelor chitinolitice
din sol, cu suprimarea bolilor plantelor (Parada et al., 2012, **Journal of Phytopathology**,
13 160: 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.,
15 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
17 (semi)solidă a tulpinilor entomopatogene de *Bacillus thuringiensis* (Wu et al., 2014, **Journal**
of Economic Entomology, 107: 137-143), antagoniste de *Trichoderma viride* (brevet RO
19 126363 B1, cu formarea de composturi/soluri supresive pentru fungii micotoxigeni din grupul
Fusarium graminearum), solubilizatoare de fosfor *Pichia farinose* (Zhu et al., 2012,
21 **Bioresource Technology**, 111:410-416).

23 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
25 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
27 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
29 la matrițele utilizate pentru compactare, generând blocări ale echipamentelor utilizate, și
riscuri de rupere a componentelor cinematice implicate în transferul forțelor de comprimare.

31 Un alt dezavantaj al utilizării substratului epuizat de la cultura ciupercilor
lignocelulozitice ca tratament la sol este determinat de variabilitatea ridicată a rezultatelor
33 finale, care depinde în mod semnificativ de microflora specifică fiecărui sol. Pentru a crește
reproductibilitatea rezultatelor aplicării substratului epuizat de ciuperci lignocelulozice ca
35 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
37 microorganisme benefice plantelor de cultură (inclusiv microorganisme biostimulante), cu
competență saprofită recunoscută.

39 Sunt cunoscute diferite procedee de condiționare sub formă de produse compactate
a microorganismelor benefice plantelor.

41 **US 2013/0324407 A1** descrie metode de obținere în cantități mari de bacterii din
genul *Methylobacterium*, care presupun inocularea unor medii bifazice care cuprind o fază
43 lichidă și o fază solidă, faza solidă în unele cazuri putând fi suspendată în faza lichidă.
Incubarea culturii se realizează în condiții care asigură dezvoltarea microorganismelor.
45 Mediile de fermentație bifazice pot fi culturi axenice. În continuare, culturile de micro-
organisme se pot recolta, de exemplu, prin filtrare. Microorganismele recoltate pot fi aderate
47 la substanța solidă. Uscarea substanței solide la care au aderat microorganisme se poate
realiza fie prin liofilizare, fie cu substanțe de uscare. Substanța solidă poate fi printre altele

RO 131931 B1

diatomit, silice, spori de ciuperci, particule din orice parte a unei plante etc. Mediile de fermentație, sau produsele mediilor de fermentație sau alte compoziții care cuprind substanțe solide, precum dialomitul, cu microorganisme aderate la acestea, pot fi utilizate în bioremediere. Compozițiile care sunt utilizate la tratarea plantelor și a părților de plante care cuprind substanțe solide, precum diatomitul, cu microorganisme aderate la acestea, mai pot conține un aditiv acceptabil din punct de vedere agricol, precum lignosulfonații.

CA 2860848 A1 prezintă tulpini microbiene, culturi de tulpini microbiene, compoziții și metode de utilizare a acestora pentru a stimula dezvoltarea și sau producția plantelor. Compozițiile descrise pot conține tulpini izolate sau o cultură de microorganisme, și pot fi lichide sau solide. Acestea mai pot cuprinde un purtător care să se preteze utilizării agricole, care poate fi solid, de exemplu, diatomit, silice, sau combinații. Formulările mai pot cuprinde și alte substraturi biologice, precum cereale, părți de plante etc. Compozițiile solide pot fi preparate prin dispersarea microorganismelor invenției în sau pe purtătorul solid care poate fi, de exemplu, diatomit, sol pasteurizat etc. În funcție de modul de utilizare, compozițiile mai pot cuprinde și alți aditivi, cum ar fi lecitină. În acest document mai sunt prezentate compoziții microbiene formulate pentru a putea fi utilizate la tratamentul semințelor, care, de asemenea, pot fi lichide sau solide. Aceste compoziții mai pot cuprinde o varietate de aditivi, printre care este menționat și lignosulfonatul de calciu. Compoziția care se depune pe semințe poate cuprinde diatomit, silice sau altele asemenea.

Documentul brevet **RO 122588 B1** se referă la o compoziție pentru creșterea plantelor, și la un procedeu de obținere a acesteia. Procedeu cuprinde trecerea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un malaxor cu manta, adăugare de K_2PO_4 pentru normalizarea pH-ului și a conținutului de potasiu, încălzire la 55...57°C și menținere timp de 30 de min, amestecând la o viteză a paletelor sigma de 2...3 rpm, răcire la temperatura mediului ambiant, inoculare de biopreparate cu eliberare controlată pe bază de *Bacillus subtilis* și *Trichoderma vinde*, menținere timp de 7...8 zile, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră.

În articolul "**Pelleted organo-mineral fertilisers from composted pig slurry solids, animal wastes and spent mushroom compost for amenity grasslands**" - **Waste Management, J. R. Rao ș.a., 2007**, este descris un procedeu de transformare a reziduurilor provenite de la ferme în fertilizanți organo-minerali sub formă de pelete. Compostul utilizat constă din bălegar de porc, gunoi de la păsări, substrat epuizat de ciuperci, coji de cacao și ziar măcinat. Compostul se amestecă în timpul peletizării cu sânge uscat și praf de pene cu suplimente minerale.

Cererea de brevet **WO 2009093261 A2** se referă la un biopesticid realizat pe baza uneia sau mai multor ciuperci microscopice entomopatogene, care se prezintă sub forma unor tablete puternic comprimate. Ciupercile entomopatogene sunt selectate din grupul reprezentat de genurile *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Verticillium* și *Nomurea*, iar tabletele conțin conidiile uneia sau mai multor ciuperci microscopice entomopatogene, protectanți UV, agenți anti-saprofitici, desiccanți, lubricanți, agenți de legare, dezintegranți și diluanți.

Brevetul **EP 0929215 B1** revendică utilizarea masei de reziduu celular, rămasă după extragerea din boabele de soia a uleiului și a proteinelor, ca biopurtător pentru realizarea unor tablete efervescente cu microorganisme utile (exemplificat prin *Lagenidium*, o oomicetă entomopatogenă). Una dintre 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. Biomasa de *Lagenidium* este încorporată în materialul biopurtător (masă de reziduu celular de soia), uscată, amestecată cu sistemul efervescent pirofosfat/bicarbonat și apoi tabletată.

RO 131931 B1

1 Brevetul **US 8940074 B2** descrie un procedeu de fabricare a biofertilizanților sub
2 formă de pelete, care include următoarele etape: amestecarea unui material biodegradabil
3 cu un material polimeric solubil în apă, pentru a forma un prim amestec; amestecarea unui
4 poliol cu apă și cu nutrienți salini, pentru a forma un al doilea amestec; amestecarea primului
5 amestec și celui de-al doilea amestec pentru a forma un conglomerat granular, ce reprezintă
6 cel de-al treilea amestec; pulverizare unor endospori de bacterii benefice pe granulele celui
7 de-al treilea amestec, pentru a forma granule de biofertilizant; extrudarea granulelor de
8 biofertilizant pentru a forma pelete compacte.

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

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

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

25 Acidul ortosilicic este un acid foarte slab, cu patru funcțiuni acide, la care valoarea
26 pKa cea mai mică este de 9,8 (**Iler, The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons,**
27 **New York, 1979, p. 207**). Aceasta înseamnă că la pH de 9,8 acidul ortosilicic este prezent
28 50% în stare nedisociată și 50% în stare disociată. Între valorile de pH 2 și 8 acidul ortosilicic
29 este o moleculă neutră, complet nedisociată. La concentrații mai mari de 2 mM începe să
30 polimerizeze, prin reacții de policondensare, cu eliberare de apă (**Mcintosh, 2012, Physical**
31 **Chemistry Chemical Physics, 14: 996-1013**). Datorită acestei tendințe de policondensare,
32 acidul ortosilicic nu poate fi inclus în mediile de cultură ale microorganismelor în concentrații
33 mari, ci trebuie să fie eliberat constant în concentrații mici, biologic active, din compuși
34 precursori. Biomasa rezultată trebuie să fie apoi ușor de condiționat în formule de tablete
35 efervescente, cu asigurarea unei supraviețuiri ridicate a microorganismelor.

36 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu ușor de
37 realizat, de obținere a unor pelete din substrat epuizat de la cultura ciupercilor ligno-
38 celulozice, bioactivate cu microorganisme benefice plantelor, în special microorganisme cu
39 activitate de biostimulare a plantelor de cultură, prin care să se asigure o rată ridicată de
40 supraviețuire a microorganismelor și o producere a peletelor. Este un alt obiect al acestei
41 invenții de a descrie un procedeu de obținere a biomasei de microorganisme cu rezistență
42 mare la condiționare, prin comprimare în structuri efervescente, prin cultivarea pe medii în
43 care sunt eliberate constant concentrații mici, active biologic, de acid ortosilicic.

44 Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

45 - cultivarea axenică pe medii minimale lichide, care includ 2% diatomită, la pH optim
46 și la aerări de până la 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un
47 interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C, timp de 3...5 zile;

RO 131931 B1

- recoltarea biomasei de microorganisme și a diatomitei prin filtrare sub vacuum de minimum 0,5 bar; 1
- uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei, recoltate prin filtrare, până la maximum 5% umiditate reziduală; 3
- 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; 5
- compactarea amestecului biomasă microorganism - diatomită - lignosulfonat de sodiu - lecitină - substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, prin presare într-o presă de pelete cu matrițe orizontale, pentru a forma pelete cu lungimea de aproximativ 15 mm și diametrul de 5...8 mm. 7
- Procedee favorizează eliberarea controlată, în etapa de cultivare axenică pe medii minimale lichide, de acid ortosilicic în concentrații care sunt sub 1 mM. 9
- 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 temperatura de ieșire, atunci când microorganismele cultivate sunt bacterii gram pozitive, care formează endospori 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 h, atunci când microorganismele sunt bacterii gram-negative. 11
- Invenția aceasta prezintă următoarele avantaje: 13
- 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; 15
- 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; 17
- reduce în mod semnificativ aderența substratului epuizat la matrița de peletizare, datorită efectului lubrifiant combinat al lignosulfonatului și al lecitinei. 19
- În continuare se prezintă exemple de realizare ce ilustrează invenția fără a o limita. 21
- Exemplul 1** 23
- 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 L, se aduc 2 L mediu minimal M9 care conține la 1 L: 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 minimum 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 3 x 10⁻⁹ M; H₃BO₃ 4 x 10⁻⁷ M; CoCl₂ · 6H₂O 3 x 10⁻⁸ M; CuSO₄ · 5H₂O 1 x 10⁻⁸ M; MnCl₂ · 4H₂O 8 x 10⁻⁸ M; ZnSO₄ · 7H₂O 1 x 10⁻⁸ M; FeSO₄ · 7H₂O 1 x 10⁻⁶ 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. 25
- 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. 27

RO 131931 B1

1 Mediul se inoculează cu 100 mL de suspensie de conidii de *Trichoderma asperellum*
2 Td36b, NCAIM P(F) 001434, normalizate la 108 propagule per ml prin numărare la lamela
3 citometrică. Tulpina *T. asperellum* Td36b este cunoscută ca având efect de biostimulare a
4 plantelor de cultură (Raut et al., 2015. *Journal of Biotechnology*, 208, S62). Se cultivă
5 tulpina Td36b timp de 5 zile, la o rată de aerare de până la 50% saturație de oxigen, cu
6 varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C.

7 Din oră în oră se prelevează aseptice probe de 2...2,4 ml mediu de cultură cu
8 microorganismele, în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Se
9 separă prin centrifugare supernatantul de sedimentul microbial și de gelul de silice, și se
10 preiau probe de câte 1 ml de supernatant, care este diluat cu 4 ml apă ultrapură, în tuburi
11 Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic
12 liber este determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Acest
13 test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un
14 complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la
15 810 nm. Concentrația absolută de acid silicic este calculată după construcția unei curbe de
16 calibrare, folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). În mediu de cultură
17 se determină o concentrație de acid ortosilicic care este permanent de sub 1 mM, fiind
18 consecința a două procese concomitente - solubilizarea siliciului sub efectul metabolismului
19 microbial, și asimilarea acidului ortosilicic. În sedimentul de microorganismele, separat de
20 diatomee și spălat, se determină siliciul total, după mineralizare, prin ICP-OES (Georgiadis
21 et al., 2013, *Geoderma*, 209: 251-261). Se constată o continuă creștere a conținutului de
22 siliciu în biomasa de microorganismele, creștere care dovedește asimilarea acidului ortosilicic
23 de către microorganismele.

24 După terminarea perioadei de cultivare se recoltează biomasa de microorganismele
25 și diatomita prin filtrare sub vacuum de minimum 0,5 bar, folosind o unitate Sartolab®
26 (Sartorius, Goettingen, Germania). Suspensia rezultată prin filtrare este resuspendată în apă
27 pură mili-Q (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-Millipore) până la 5% substanță
28 uscată. Suspensia rezultată se usucă până la maximum 5% umiditate reziduală, pe o
29 instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare,
30 la o turație de cel puțin 20000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului
31 de uscare de 130...140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 75...80°C.
32 O instalație de uscare prin pulverizare, ce poate fi utilizată în acest scop, este, de exemplu,
33 Niro Production Minor Unit, produsă de Niro Gea (Soeborg, Danemarca), sau Laboratory
34 spray dryer, produsă de ICF Cibec (Maranello, Italia). Orice alt tip de instalație de uscare prin
35 pulverizare, cu caracteristici tehnice similare, poate fi utilizată.

36 Se iau 10 părți biomasă de microorganismele și siliciu coloidal uscate, care se aduc
37 într-un amestecător în pat fluidizat (MiniGlatt, Glatt, Binzen, Germania), împreună cu 9 părți
38 biomasă de microorganismele și diatomită, cu 1,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,4 părți lecitină,
39 87,1 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14%
40 umiditate reziduală, și măcinat la o granulație de 1...2 mm, părțile fiind exprimate în unități
41 de masă.

42 Lignosulfonatul de sodiu folosit este Borresperse NA (Borregarrd, Sarsborg,
43 Norvegia), cu următoarele caracteristici: substanță uscată minimum 93%; calciu maximum
44 0,6%, pH (soluție 10%) de 8,3 ± 0,8, dar poate fi utilizat orice alt lignosulfonat cu
45 caracteristicile de mai sus.

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

RO 131931 B1

Amestecul rezultat prin omogenizare în pat fluidizat se peletizează folosind o presă (moară) de pelete 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 pelete cu lungimea de aproximativ 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.

Peletele rezultate sunt stabile, 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 minimum 5×10^7 ufc/g, și nu scade cu mai mult de 10% prin stocarea peletelor bioactivate, la temperatura camerei, timp de 6 luni.

Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se folosește glucoza 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 128931**), 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.

Peletele rezultate sunt stabile, 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 minimum 10^8 ufc/g, și nu scade cu mai mult de 10% prin stocarea tabletelor la temperatura camerei, timp de 6 luni.

Exemplul 3

Se procedează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se folosește glucoza 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 **EP 2738267 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 h.

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.

Peletele rezultate sunt stabile, 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 minimum 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 în domenii prioritare — PN II, derulat cu sprijinul MEN - UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0846, contract 159/2014 CERES.

Revendicări

1

3

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 h la 20°C și 12 h la 30°C, timp de 3...5 zile; recoltarea biomasei de microorganisme și a diatomitei prin filtrare sub vacuum de minimum 0,5 bar; uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei recoltate prin filtrare, până la maximum 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 pelete cu matrițe orizontale, pentru a forma pelete cu lungimea de aproximativ 15 mm și diametrul de 5...8 mm.

11

13

15

17

19

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.

21

23

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 endospori, 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 h, atunci când microorganismele sunt bacterii gram-negative.

25

27

29

