



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2023 00699**

(22) Data de depozit: **15/11/2023**

(41) Data publicării cererii:  
**29/03/2024** BOPI nr. **3/2024**

(71) Solicitant:  
• **CHEMARK ROM S.R.L.**,  
**STR.CONSTANTIN BRÂNCOVEANU,**  
**NR.34, BL.15, SC.A, AP.5, BRAȘOV, BV,**  
**RO**

(72) Inventatori:  
• **INVENTATORI NEDECLARAȚI, \*, RO**

(54) **MACERAT FERMENTAT DIN PLANTE CU EFECT  
BIOSTIMULANT ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de macerat fermentat din plante utilizată ca biostimulant pentru plantele de cultură și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția conform invenției are următorul conținut pentru 1 litru de extract fermentat: minim 98 mg de poliamine, 127 mg de acizi hidroxicinamici totali, 320 mg flavonoide totale, 200 mg seleniu, 85 mg acid silicic și 21,4 grame oligozaharide pectice și are o activitate anti-oxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox/g extract. Procedeu conform invenției are următoarele etape:

a) măcinarea umedă a materialului vegetal, care poate fi urzică sau coada calului, până la dimensiuni de 2,5...5 mm și aplicarea la 1 kg de material vegetal umed a unui pretratament cu microunde, pentru destructurarea parțială a lignocelulozei, timp de 8 min., la o putere se 300 W, până la o temperatură de 75°C,

b) amestecarea materialului vegetal cu apă distilată sterilă în raport de 1 : 10, inocularea materialului cu o tulpină de lactobacili microaerofili în proporție

de 10<sup>7</sup> ufc pentru fiecare ml de mediu de inoculat, fermentându-se în condiții de microaerofilie, timp de 10 zile la temperaturi de 18...20°C,

c) continuarea fermentării cu monitorizare zilnică a activității antioxidante, până la atingerea unei activități de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox/g extract,

d) omogenizarea maceratului fermentat prin treceri de două ori, la presiunea de 150 MPa, printr-un omogenizator cu piston și diluarea de 5 ori a omogenizatului de macerat cu apă distilată,

e) filtrarea prin strat multiplu de diatomită cu cel puțin 85% silice amorfă și sub 1% silice cristalină,

f) adăugarea în filtrat a unei surse de Se, selenat sau selenit de Se sau drojdie seleniată, până se ajunge la 200 mg Se/1 l de compoziție, trecerea filtratului în recipiente de polipropilenă și pasteurizarea în câmp de microunde timp de 6 min., la o putere de 450 W, până la atingerea temperaturii de 85°C.

Revendicări: 5



## MACERAT FERMENTAT DIN PLANTE CU EFECT BIOSTIMULANT ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

Prezenta invenție se referă la o compoziție de macerat fermentat din plante, destinat utilizării ca biostimulant pentru plantele de cultură, ca și la un procedeu de obținere a acestei compoziții.

Sunt cunoscute diferite compoziții de macerate / extracte (fermentate) din plante, cu acțiune complexă, de nutriție a plantelor de cultură, de protecție a acestora față de agenții patogeni și/sau insecte, și de stimulare a fiziologiei plantelor, inclusiv prin activarea sistemelor de apărare. Astfel de compoziții sunt obținute prin: (i) fermentarea maceratelor diferitelor plante, în special urzică (*Urtica dioica*) și coadacalului (*Equisetum* spp.); (ii) prin extracția diferitelor tipuri de compost vegetal sau (iii) prin combinarea extractelor lichide de compost cu macerate fermentate de plante. Aplicarea maceratului de urzică (*Urtica dioica*) obținut prin extracția și fermentarea timp de 14 zile a biomasei de urzică, în proporție de 183 grame la 10 litri de apă, a determinat o stimulare a creșterii vegetale și a acumulării de fier (Maričić et al. 2021, *Sustainability*, 13(7), 4042). Maceratul fermentat de *E. arvense* a determinat o stimulare a preluării nutrienților de către orezul cultivat într-o tehnologie de tip *low-input* (Valdez și Fernandez, 2008, *Philippine Journal of Crop Science*, 33(1), 37-58). Compozițiile de macerate din plante fermentate 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 posibilei prezențe a unor bacteriilor enterotoxigene, care pot contamina recolta de fructe și legume proaspete.

Cererea de brevet WO2012054098 A1 descrie un macerat din plante 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 maceratului 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, cea

ce permite ca cel puțin 50% din micro-organisme să rămână viabile timp de 12 luni. Soluția propusă menține activitatea biologică a maceratului din plante 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*). Adaosul 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 chimic de spectru larg restricționează utilizarea produsului în sistemele de agricultură organică / ecologică (în care nu sunt permise produse de sinteză chimică).

Cererea de brevet RO130241 A0 se referă la un procedeu de stabilizare a unui macerat de urzică fermentat. Procedeu constă în 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.

Dezavantajul compozițiilor stabilizate de macerate fermentate este dat de reproductibilitatea redusă a efectelor, datorită variabilității mari a conținutului de ingrediente active și unui conținut scăzut de nutrienți (Garmendia et al. 2018. *PeerJ*, 6, e4729). Cererea de brevet CN 104370625 A protejează o compoziție alcătuită din biomasă de urzici: 30% -70%; 0,5% - 2% agent microbian de fermentare, 1% -5%

fosfat monopotasric, 0,5% -2% sulfat de magneziu anhidru, 0,05% -0,5% clorură de calciu anhidră, 0,05% -0,3% borax și 25% -65% apă, ca și un procedeu de obținere a acestuia. Procedeu cuprinde următorii pași: amestecarea materiilor prime și apoi efectuarea fermentației anaerobe timp de 7-15 zile la 28-35° C și filtrarea materialului fermentat pentru a obține maceratul fermentat. Procedeu nu include nici o metodă de asigurare a calității și reproductibilității procesului de fermentare anaerobă, care să determine formarea unui produs stabil, cu rapoarte bine stabilite între diferitele ingrediente active și cu efecte reproductibile.

Compușii activi din maceratul de urzică fermentat sunt poliaminele, acidul silicic și oligomerii săi, polifenoli / flavonoide. Poliaminele sunt regulatori de creștere ubicuitari 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 sau de coada calului 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 sau de coada-calului (denumit uzual și purin de urzică sau purin de coada calului, prin asociere cu zeama fermentată scursă din bălegar, care are același miros specific, determinat de poliaminele cu denumiri sugestive – putresceină, cadaverină).

Acidul silicic și oligomerii săi sunt 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 - Coskun *et al.* 2019, *New Phytologist*, 221(1), 67-85). 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 (Golawska *et al.*, 2008,

*Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128 (1), 147–153). Țesuturile de urzică (*U. 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.). Polifenolii au un efect de biostimulare a plantelor și sinergizează efectul siliciului (Ceccarini *et al.* 2019, *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 95-104).

Destructurarea peretelui celular vegetal lignocelulozic eliberează o serie de oligozaharide, care reprezintă un tipar molecular asociat distrugerilor (DAMP - *damage-associated molecular patterns*), implicat în activarea sistemelor de apărare din plante (Tanaka și Heil, 2021. *Annual Review of Phytopathology*, 59, 201-224). Activarea sistemelor de apărare de către DAMP 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 DAMP, cu o acțiune de stimulare a mecanismelor de apărare din plante, este sinergică celorlalte componente active din maceratul fermentat de material vegetal.

Autorii au descoperit că adăugarea unor mici cantități de săruri de seleniu sinergizează suplimentar acțiunea de biostimulant a maceratelor din material vegetal.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a dezvolta o compoziție de macerat fermentat din plante, care să aibă o activitate biologică reproductibilă datorită unei compoziții standardizate, și un procedeu de obținere a respectivei compoziții.

Compoziția de macerat fermentat conform invenției conține minimum 98 mg de poliamine, 127 mg de acizi hidroxicinamici totali, 320 mg flavonoide totale, 200 mg seleniu, 85 mg acid silicic și 21,4 grame oligozaharide pectice la 1 litru extract fermentat și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox per g extract.

Procedeu conform invenției constă în următoarele etape:

- ✓ Măcinarea umedă a materialului vegetal până la dimensiuni de 2,5- 5 mm;
- ✓ Aplicarea la 1 kg de material vegetal umed a unui pre-tratament cu micro-unde, pentru destructurarea parțială a lignocelulozei, timp de 8 min, la o putere de 300 W, până la o temperatură de 75°C;

- ✓ Amestecare materialului vegetal cu apă distilată sterilă., în raport de 1 kg material vegetal la 10 kg apă distilată, inocularea materialului cu o tulpină de lactobacili microaerofili,  $10^7$  ufc pentru fiecare ml de mediu de inoculat, și se fermentează în condiții de microaerofilie, timp de 10 zile la temperatura de 18...20°C;
- ✓ Continuare fermentării prin monitorizarea zilnică a activității anti-oxidante de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, până la atingerea unei activități de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox per g extract;
- ✓ Omogenizarea la înaltă presiune a maceratului fermentat de material vegetal, 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 distilată;
- ✓ Filtrarea prin strat multiplu de filtru de diatomită, care conține cel puțin 85% silice amorfă și sub 1% silice cristalină de tip cristobalit;
- ✓ Adăugarea în filtrat a unei surse de seleniu, astfel încât conținutul de seleniu din compoziție să fie de 200 mg seleniu la 1 litru de compoziție;
- ✓ Trecerea filtratului în recipiente de polipropilenă și pasteurizarea acestuia prin aplicarea unui tratament în câmp de microunde, timp de 6 min la o putere de 450 W, până la atingerea unei temperaturi de 85°C.

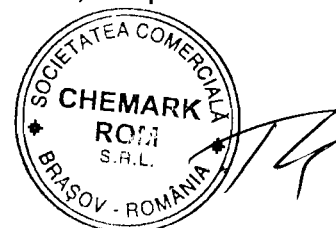
Materialul vegetal folosit poate fi urzică, *Urtica dioica* sau coada calului, *Equisetum arvense*.

Tulpina de lactobacili microaerofili folosită este orice tulpină care are capacitatea de a produce, după o zi de fermentare pe material vegetal, feruloil-esterază care are o activitate de cel puțin 10 unități enzimatică per ml de mediu inoculat.

Sursa de seleniu poate fi selenat de sodiu, selenit de sodiu sau drojdie seleniată.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Prezintă o activitate biologică reproductibilă, datorită realizării unei compoziții reproductibile, ca urmare a monitorizării fermentației și a continuării acesteia până la o activitate antioxidantă minimă;
- Activează în mod eficient toleranța plantelor la stresurile abiotice, și în special la cele hidrice, datorită interacțiunii sinergice dintre componente, în special seleniu și siliciu;



- Favorizează eliberarea acizilor hidroxicinamici din peretele celular datorită pre-tratamentului cu microunde și fermentației cu tulpini de lactobacili microaerofili care produc cantități semnificative de feruloil esterază;
- Asigură obținerea unei cantități ridicate de acid silicic în macerat, datorită utilizării procedurii de filtrare pe diatomită cu un conținut ridicat de silice amorfă, material care are capacitatea de a elibera acid silicic;
- Prezintă o stabilitate ridicată în timp datorită ruperii celulelor de microorganisme în etapa de omogenizare la înaltă presiune, a filtrării pe diatomită și a pasteurizării cu microunde;
- Elimină orice bacterie entero-toxigenă eventual prezentă ca urmare a ruperii celulelor de microorganisme în etapa de omogenizare la înaltă presiune, a filtrării pe filtru de diatomită și a pasteurizării cu microunde;

Prezenta invenție este ilustrată de următorul exemplu.

*Exemplu 1.* Se iau 3 kg de părți aeriene de urzică, care se măcină pe o moară cu cuțite (Willey model 4, Thomas, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA), prevăzută cu o sită de 0,5 cm. Se trece materialul vegetal într-un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem, Neyron, Franța) și se aplică un pre-tratament cu microunde, pentru destructurarea parțială a lignocelulozei, timp de 8 min, la o putere de 300 W, până la o temperatură de 75°C. Materialul vegetal pre-tratat se trece într-un vas de fermentare (Klarstein, Chal-Tec, Berlin, Germania). Se adaugă 30 litri de apă distilată sterilă. Se inoculează cu 300 ml dintr-o suspensie care conține 109 ufc/ml. dintr-o tulpină de lactobacili producători de feruloil-esterază, de ex. *Lactobacillus plantarum* R1012. Se menține 1 zi la temperatura de 18...20°C și se preia o probă în care se determină activitatea feruloil-esterazei. Se determină o activitate de 10 unități enzimatică per ml de mediu inoculat. O unitate enzimatică este definită ca fiind aceea cantitate de enzimă care produce 1 μmol de acid ferulic per minute din etil-ferulat (0,39 mM) în tampon fosfat de sodiu (100 mM), la pH 6,5 și la 40°C.

Se continuă fermentarea în condiții de microaerofilie timp de 10 zile la temperatura de 18...20°C. După 10 zile se preia o probă în care se determină activitatea anti-oxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil printr-o metodă cunoscută (Sharma și Bhat, 2009, *Food Chemistry*, 113, 1202-1205). Fermentarea este monitorizată zilnic prin determinarea zilnică a activității anti-oxidante de captare a radicalului DPPH, până la atingerea unei activități de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox per gram de extract fermentat.

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 diatomită, care conține cel puțin 85% silice amorfă și sub 1% silice cristalină de tip cristobalit (Clarcel®, Ceca-Arkema, Colombes, Franța). Diatomita nu are numai rol în reținerea particulelor grosiere de plantă, ci și pentru normalizarea nivelului de acid silicic spre maximum de solubilitate, cunoscut fiind faptul că diatomita este o sursă de siliciu solubil (Constantinescu-Aruxandei et al, 2020, *Agronomy*, 10,1791).

Se adaugă în filtrat 0,438 grame de selenit de sodiu la 1 litru, astfel încât conținutul de seleniu din compoziție să fie de 200 mg seleniu la 1 litru de compoziție. Compoziția rezultată se trece în recipiente sterilizate, care se închid aseptice și se pasteurizează prin aplicarea unui tratament în câmp de microunde, timp de 6 min la o putere de 450 W, până la atingerea unei temperaturi de 85°C.

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)); seleniul total prin ICP-OES cu generare de hidruri (Welna et al, 2014, *Food Analytical Methods*, 7(5), 1016-1023), acidul silicic, 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 DAMPS (ca oligozaharide pectice, prin electroforeză capilară, conform metodei lui Ström și Williams, 2004, *Carbohydrate Research*, 339, 1711-1716.).

Compoziția de macerat fermentat rezultată conține minimum 98 mg de poliamine, 127 mg de acizi hidroxicinamici totali, 320 mg flavonoide totale, 200 mg seleniu, 85 mg acid silicic și 21,4 grame oligozaharide pectice la 1 litru extract fermentat și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH 2,2-difenil-1-

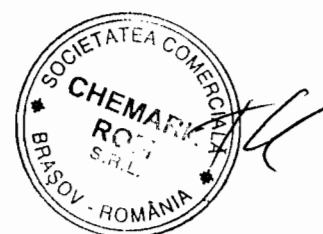


picrililhidrazil, de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox per g extract. Nivelele ingredientelor active sunt similare cu cele descrise în literatură ca având efectele specifice de stimulare a răspunsului de apărare din plante și de inhibare a hrănirii afidelor.

*Exemplul 2.* Se lucrează la fel ca în Exemplul 1, singurele diferențe fiind că se folosesc părți aeriene de coada calului, *E. arvense*, ca material vegetal și se adaugă 0,4787 g de selenat de sodiu la 1 litru de compoziție, astfel încât conținutul de seleniu din compoziție să fie de 200 mg seleniu la 1 litru de compoziție.

*Exemplu 3.* Se lucrează la fel ca în Exemplul 1, singura diferență fiind că se introduc 100 g de drojdie seleniată, cu un conținut de 2 mg seleniu pe 1 g de drojdie.

*Exemplu 4.* Se testează activitatea de biostimulant de creștere a compoziției realizate printr-un biotest de înalt randament pentru a se evidenția efectul biostimulant prin combaterea acțiunii stresului hidrosalin. Biotestul de înalt randament folosit implică germinarea și creșterea plantelor de *Arabidopsis thaliana* pe medii în care se aplică un stres hidric salin - soluții de clorură de sodiu (Ugena et al. 2018, *Frontiers in Plant Science* 9, 1327) Semințele de *A. thaliana* (ecotip Col-0) au fost sterilizate la suprafață și puse la germinat pe plăci pătrate de 12 cm x 12 cm conținând un mediu MS, Murashige și Skoog, (pH 5,7) ½, completat cu un agent de gelifiere (0,5% Phytigel; Sigma-Aldrich, Germania). Semințele au fost păstrate timp de 4 zile la 4°C la întuneric. Plăcile au fost apoi poziționate vertical într-o cameră de creștere în condiții controlate, 22°C, 16/8 ore ciclu lumină întuneric, la o intensitate luminoasă de 120 mmoli einstein/m<sup>2</sup>/s. La trei zile după germinare, răsadurile de mărime similară au fost transferate în condiții sterile în plăci cu 48 godeuri (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Fiecare răsad a fost transferat în câte un godeu umplut cu 850 μl de mediu MS (pH 5,7; completat cu 0,6% Phytigel), la care s-a adăugat NaCl de 75 și 150 mM, pentru a genera stres salin. S-au aplicat pe fiecare plantulă un tratament prin picurare cu 50μl de compoziție conform ex.1 și de compoziție conform ex.1 fără seleniu. După 10 zile de cultivare în condiții controlate, 22°C, 16/8 ore ciclu lumină întuneric, la o intensitate luminoasă de 120 mmoli fotoni/m<sup>2</sup>/s și umiditate de 60%, s-au preluat imaginile plantelor dezvoltate în fiecare godeu și s-a determinat suprafața foliară prin analiza imaginii. Compoziția cu seleniu este cu peste 40% mai activă decât cea fără seleniu în protejarea plantelor față de stresul hidrosalin.



**REVEDICĂRI**

1. Compoziția de macerat fermentat conform invenției **caracterizat prin aceea că** are un conținut de minimum 98 mg de poliamine, 127 mg de acizi hidroxicinamici totali, 320 mg flavonoide totale, 200 mg seleniu, 85 mg acid silicic și 21,4 grame oligozaharide pectice la 1 litru extract fermentat și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox per g extract.
2. Procedul conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a materialului vegetal până la dimensiuni de 2,5-5 mm; aplicarea la 1 kg de material vegetal umed a unui pre-tratament cu micro-unde, pentru destructurarea parțială a lignocelulozei, timp de 8 min, la o putere de 300 W, până la o temperatură de 75°C; amestecare materialului vegetal cu apă distilată sterilă., în raport de 1 kg material vegetal la 10 kg apă distilată, inocularea materialului cu o tulpină de lactobacili microaerofili,  $10^7$  ufc pentru fiecare ml de mediu de inoculat, și se fermentează în condiții de microaerofilie, timp de 10 zile la temperatura de 18...20°C; continuare fermentării prin monitorizarea zilnică a activității anti-oxidante de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, până la atingerea unei activități de cel puțin 6,5 mg echivalent Trolox per g extract; omogenizarea la înaltă presiune a maceratului fermentat de material vegetal, 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 distilată; filtrarea prin strat multiplu de filtru de diatomită, care conține cel puțin 85% silice amorfă și sub 1% silice cristalină de tip cristobalit; adăugarea în filtrat a unei surse de seleniu, astfel încât conținutul de seleniu din compoziție să fie de 200 mg seleniu la 1 litru de compoziție; trecerea filtratului în recipiente de polipropilenă și pasteurizarea acestuia prin aplicarea unui tratament în câmp de microunde, timp de 6 min la o putere de 450 W, până la atingerea unei temperaturi de 85°C.
3. Procedul conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** materialul vegetal folosit poate fi urzică, *Urtica dioica* sau coada calului, *Equisetum arvense*.
4. Procedul conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** tulpina de lactobacili microaerofili folosită este orice tulpină care are capacitatea de a produce, după o zi de fermentare pe material vegetal, feruloil- esterază care are o activitate de cel puțin 10 unități enzimatică per ml de mediu inoculat.
5. Procedul conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** sursa de seleniu poate fi selenat de sodiu, selenit de sodiu sau drojdie seleniată.

