



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00897**

(22) Data de depozit: **25/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/12/2017** BOPI nr. **12/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2014 BOPI nr. **12/2014**

(73) Titular:
• **TRANSPROIECT ORGANIC SRL,**
SAT MALIUC, ALEEA IRIS NR. 1, AP. 3,
COMUNA MALIUC, TL, RO

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

• **DOBRONAUTEANU EMANUEL**
CORNELIU, INTRAREA BITOLIA NR. 28,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 6022394; CN 101786916 A

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI FERTILIZANT
DIN VINASĂ**

Examinator: **ing. ANCA MARINA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat,
la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în
termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de
acordare a acesteia

RO 129937 B1

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui fertilizant din vinasă, (co)produs de la utilizarea melasei în procese industriale fermentative, în special de la fabricarea (bio)etanolului din melasă, respectiv a unui fertilizant organo-mineral, care conține acizi humici, și a unui fertilizant azotat cu acțiune osmo-protectantă datorită prezenței (glicin)betainei.

Sunt cunoscute diferite procedee prin care se urmărește valorificarea ca agro-fertilizant a compușilor acumulați în vinasă, care au o valoare biologică ridicată pentru plante. Potasiul, prezent în vinasă în cantități care pot ajunge la peste 1%, reprezintă un element nutritiv major pentru plante. (Glicin)Betaina, prezentă în melasă în cantități mari, neutilizată de către drojdii în timpul fermentației alcoolice și concentrată în vinasă, este un donor de grupări metil, implicat în accelerarea ciclului metioninei (metionină - S-Adenozil - metionină - homocisteină - metionină). Acest ciclu al metioninei are rol în reglarea: (i) exprimării genelor prin metilare, inclusiv a răspunsului epigenetic la factorii de mediu, și (ii) lanțului de molecule semnal, intra- și inter-celular, poliamine - oxid nitric - peroxinitrit. Datorită acestei implicări în reglarea metabolismului unor compuși cheie, (glicin)betaina este un compus versatil cu importanță majoră în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici (**Ahmad et al., 2013, Plant Biotech. Rep., 7: 49-57**). Efectul osmoprotectant, de protejare a plantelor față de stresul hidric datorat lipsei de precipitații, secetei și/sau salinității, are implicații semnificative în actualul context al schimbărilor climatice, caracterizat de schimbarea tiparului precipitațiilor și creșterii riscului de secetă.

Problemele tehnice în utilizarea vinasei ca fertilizant/fertirigant sunt determinate de: (i) instabilitatea microbiologică a vinasei, datorită prezenței drojdiei de fermentație, inactivate parțial prin distilare, care face ca vinasa să nu poată fi păstrată ca atare mai mult de 10 zile; (ii) clastogenitatea/mutagenitatea prin aberații cromozomiale, determinată de melanoidinele/compușii humici (solubili) formați și acumulați în timpul tratamentelor termice repetate, incluse în procedeele tehnologice care duc la obținerea melasei și apoi a vinasei (**da Silva et al., 2013, Environ. Monit. Assess., 185: 1627-1636**); (iii) toxicitatea pentru organismele acvatice a melanoidinelor solubile din vinasă aplicată ca fertirigant/fertilizant, care pot fi spălați din sol în apele de suprafață (**Botelho et al., 2012, Tox. Environ. Chem. 94:2035-2045**); (iv) modificările nefavorabile ale caracteristicilor solurilor, ca urmare a aplicării vinasei, trecute recent în revistă de **Christofolletti et al., 2013, Waste Manag. 33:2752-2761**, și în special depleția în mangan; (v) riscul semnificativ de formare a unor compuși melanoidinici toxici suplimentari, în cazul stabilizării (microbiologice) prin concentrare cu evaporare a apei, și riscul de încrustare a țevilor, din schimbătoarele de căldură și/sau concentratoarele prin evaporare, datorită precipitării sărurilor de calciu și magneziu prezente în vinasă; (vi) cantități mari de carbon organic total, biodegradabil de către flora microbiană, prezent în unele compoziții de vinasă, care determină indisponibilizarea pentru plante a azotului prezent în vinasă; (vii) necesitatea asigurării unei viteze mari a procedeeleor ridicate la scară, impusă de cantitățile importante de vinasă formate la fabricarea (bio)etanolului din melasă - de exemplu aproximativ 9 hl vinasă la 1 hl (bio)etanol.

Brevetul **US 5851405** descrie un procedeu de clarificare și de recuperare a potasiului și a betainei din vinasă. Clarificarea vinasei se realizează după corectarea pH-ului, de preferat de la 6,5 la 7,5, pe un separator centrifugal, la 9000 x g. Vinasa clarificată este concentrată într-un evaporator circular, până la un conținut de solide de 59% până la 65%. Cristalele de sulfat de potasiu, care încep să se formeze de la circa 40% substanță uscată în vinasa concentrată, sunt îndepărtate prin decantare și filtrare pe un filtru presă, cu pământ de diatomee ca adjuvant de filtrare. Vinasa concentrată rezultată este diluată și supusă unei

separări cromatografice de schimb ionic, pentru recuperarea betainei. Procedul implică operații de concentrare, urmate de diluarea vinasei concentrate și de reconcentrarea eluatului cromatografic care conține betaina. În timpul procesului de concentrare, desfășurat la temperaturi ridicate, riscul formării de noi compuși melanoidinici (solubili) este ridicat. În cadrul procedurii descris prin brevetul US 5851405 , nu sunt revendicate etape prin care acești compuși organici potențial periculoși să fie inactivați.	1
Cererea de brevet WO 2010/070622 descrie un procedeu de electro-flotație/oxidare, prin care se reduc carbonul organic total, consumul de oxigen și solidele totale din vinasă, inclusiv compușii melanoidinici potențial periculoși, care implică următoarele etape: introducerea vinasei în celule electrolitice prevăzute cu electrozi de oțel galvanizat, ajustarea pH-ului vinasei la o valoare cuprinsă între 7 și 14, de preferat între 7 și 11, aplicarea unei curenți constant, la o densitate de curenți cuprinsă între 20 și 40 mA/cm ² , injectarea, continuă sau secvențială, de peroxid de hidrogen în vinasă, în imediata vecinătate a electrozilor, într-o concentrație care este cuprinsă între 10 și 67000 ppm H ₂ O ₂ pe litru de vinasă, de preferat între 1000 și 67000 ppm H ₂ O ₂ pe litru de vinasă, înlăturarea vinasei tratate din celula electrolitică și separarea solidelor insolubile flocluate prin gravitație, filtrare sau centrifugare.	7
Un prim dezavantaj al procedurii descris mai sus este utilizarea unor cantități relativ mari de apă oxigenată, compus relativ scump și care necesită precauții în utilizare. În plus, procedul descris nu include etape ulterioare de utilizare a vinasei purificate prin procedul de electro-flotație/oxidare.	9
Autorii au perfecționat procedul descris în WO 2010/070622 în cadrul cererii WO2011/158195 , în care floclarea este favorizată prin adăugarea unui co-adjuvant, supernatantul este reintrodus în faza de floclare pentru a reduce suplimentar carbonul organic total, electrozii sunt de fier, oțel, carbon, aluminiu, sau o combinație a lor, pH-ul este în domeniu acid, între 4 și 5, încărcătura coulombiană a reactorului electrochimic este între 5000 și 10000 C/l, la o densitate a curenților între 0,3 și 2 mA/cm ² , peroxidul de hidrogen se reduce la maximum 5000 ppm, iar solidele obținute prin floclare sunt folosite pentru obținerea de (bio)combustibili sau agro-fertilizanți.	11
Procedul perfecționat continuă să utilizeze cantități importante de apă oxigenată, de maximum 5000 ppm, nu valorifică în scopuri agronomice betaina, reținută în supernatant și supusă unor degradări oxidative repetate, și nu tratează diferențiat compușii melanoidinici, în funcție de efectele lor benefice asupra plantelor sau potențial (geno)toxice.	13
În documentul US 6022394 , este prezentat un procedeu de fracționare a vinasei, procedeu în care valoarea pH-ului borhotului este redus prin adăugarea de acid, iar precipitatul format se separă, în scopul de a obține o fracție anorganică și o fracție organică. Din fracțiunea anorganică care conține în principal săruri de potasiu, se pot obține îngrășăminte. Fracțiunea organică conține în principal acizi organici, și se poate folosi ca aditiv în hrana animalelor.	15
De asemenea, în documentul CN 101786916 , este prezentat un bio-îngrășământ produs prin fermentarea zgurii de oțel, reziduuri de oțet și de cărbune în prezența unor microbi, și o metodă de preparare a acestora. Bio-fertilizatorul cuprinde următoarele componente, în procente de greutate: 15...20% de zgură de oțel, 5...73% de reziduuri oțet, 10...15% de cărbune și 0,05...0,1% de microbi. Metoda de preparare cuprinde următoarele etape: selectarea microbilor; activarea microbilor; amestecare; fermentare; obținerea de produse finite; uscare la temperatură scăzută; ambalare. Zgura de oțel, reziduul de oțet și cărbunele sunt supuse la temperaturi ridicate de fermentare, prin utilizarea microbilor; oxizii metalici din zgura de oțel și acidul organic în reziduul de oțet suferă reacția de neutralizare	17

și generează un complex organic sub acțiunea cărbunelui și a microbilor, astfel încât se îmbunătățește eficiența îngrășământului; metoda poate fi aplicată pentru diferite deșeuri industriale și agricole, cum ar fi funinginea într-o centrală electrică, vinasă într-o fabrică de vin, gunoi urban și altele asemenea.

O parte din materia organică îndepărtată prin procedeul de electro-flotație/oxidare este reprezentată de compuși melanoidinici din categoria acizilor humici (**Hatano et al., 2008, Chemosphere, 71:1730-1737**). Acizii humici au un rol semnificativ în formarea solului (**Tarchitzky et al., 2000, Soil Sci. 165, 328-342**), și în favorizarea nutriției și creșterii plantelor (**Nardi et al., 2002, Soil Biol. Biochem., 34: 1527-1536**), inclusiv datorită unor efecte asemănătoare fitohormonilor. Pentru a valorifica acești compuși cu efect benefic pentru plante, cererea de brevet **WO 2009/129589** prezintă un procedeu de obținere a unui fertilizant organo-mineral granulat, alcătuit din următoarele etape: concentrarea prin evaporare a vinasei până la 65% substanță uscată, amestecarea vinasei concentrate cu nămol de filtrare de la obținerea siropului de zahăr, uscat de preferință până la 10...20% umiditate reziduală, adăugarea de cenușă de la arderea bagasei de trestie de zahăr și/sau a altor resturi vegetale de trestie de zahăr, adăugarea de macro-nutrienți, primari (N, P, K) și secundari (Ca, Mg, S), și de micro-nutrienți (Zn, Fe, Cu, Cl, Bo, Mn, Mo), pentru a obține diferite formulări agrochimice organo-minerale corespunzătoare diferitelor tipuri de aplicații necesare cultivării plantelor.

Procedeul descris mai sus este aplicabil numai în fabricile de (bio)etanol din trestie de zahăr, și nu se poate aplica și fabricilor de (bio)etanol obținut din melasă, de trestie de zahăr și/sau sfeclă de zahăr, în care nu se produce nămol de la filtrarea siropului de zahăr și cu atât mai puțin bagasă de trestie de zahăr. Procedeul implică etape în care consumul de energie este ridicat, cum este, de exemplu, etapa de concentrare prin evaporare a vinasei, și nu include măsuri de evitare a formării suplimentare de compuși melanoidinici potențial toxici.

Nici procedeul descris prin cererea de brevet **WO 2009/129589** nu tratează diferențiat compușii melanoidinici în funcție de efectul lor, benefic în cazul acizilor humici, complexe moleculare cu solubilitate redusă, sau (potențial) toxic în cazul acizilor fulvici, melanoidine cu solubilitate mai ridicată în apă. În noua perspectivă asupra compușilor humici, reliefată de noile tehnici de investigație, prezentată pe larg, de exemplu de **Sutton și Sposito, 2005, Environ. Sci. Technol., 39:9009-9015**, acizii humici sunt complexe macromoleculare de compuși melanoidinici, stabilizate de interacțiuni hidrofobe și de legături de hidrogen, insolubile la pH acid și solubilizate la pH bazic datorită destabilizării interacțiunii hidrofobe, iar acizii fulvici sunt compuși melanoidinici solubili în apă, atât la pH acid, cât și la pH bazic, cu o prezență semnificativă a resturilor polare de (5 metil)-2-furfural, formate prin deshidratarea termică a moleculelor de carbohidrați. Acizii humici, cu solubilitate scăzută și caracter hidrofob mai pronunțat, au un efect benefic asupra structurării și fertilității solului, ca și asupra nutriției și stimulării plantelor de cultură (**Schnitzer și Moreal, 2011, Advan. Agron., 113:139-213**). În categoria denumită generic acizi fulvici, compuși melanoidinici cu o solubilitate pronunțată și care au și o capacitate mai ridicată de trecere prin diferitele bariere de permeabilitate din diferitele organisme, sunt incluse și melanoidinele solubile responsabile de clastogenitatea/mutagenitatea prin aberații cromozomiale și de toxicitatea pentru organisme acvatice a compușilor spălați din solurile fertilizate/fertirigate cu vinasă.

Vinasa are un conținut ridicat de acizi fulvici și redus în acizi humici (**Tejada și Gonzalez, 2005, Europ. J. Agron. 23: 336-347**). Rolul manganului în catalizarea humificării abiotice, demonstrată, de exemplu, de către **Jokic et al., 2001, Geophys. Res. Lett.,**

28: 3899-3902 , explică și depleția în mangan a solurilor tratate cu cantități mari de vinasă cu acizi fulvici/melanoidine solubile, compuși incomplet humificați, care descreșc conținutul de mangan din soluri, prin complexare și modificare a stării de oxidare, ca urmare a reacțiilor de humificare până la acizi humici.	1
Este deci necesară dezvoltarea unui procedeu prin care să valorifice și beneficiile agronomice ale acizilor humici din vinasă, limitându-se riscurile asociate compușilor melanoidinici solubili/acizilor fulvici din vinasă. Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este de a descrie un astfel de procedeu, prin care să se realizeze reacții de humificare la acizi humici a acizilor fulvici din vinasă, și care să permită valorificarea completă a melanoidinelor din vinasă, prin obținerea de agro-fertilizanți organici/organo-minerali, cu risc redus de afectare a diferitelor componente ale mediului.	3
Procedeul conform invenției cuprinde următoarele etape:	5
Separarea unui concentrat de drojdie din vinasă, care conține cel puțin 10% drojdie, prin utilizarea unui separator centrifugal, la minimum 8500 x g, omogenizarea sub presiune a concentratului de drojdie, răcirea omogenizatului și menținerea lui la 4°C până la utilizarea ulterioară.	7
Aducerea pH-ului vinasei clarificate la valoarea 4 și adăugarea de zgură de oțelărie, în proporție de 2 părți zgură la 98 părți vinasă, și menținerea la 60°C, sub agitare, 20 rpm, și aerare, 0,2 l aer/l mediu/min, timp de 12 h, pentru a favoriza catalizarea reacției de humificare de către oxizii de mangan și fier prezenți în zgura de oțelărie.	9
Răcirea amestecului la 25°C, modificarea pH-ului amestecului la 3,5 și adăugarea de biocărbune, în raport de 2 părți biocărbune la 100 părți amestec vinasă - zgură de oțelărie, și menținerea, sub agitare, 20 rpm, timp de 3 h;	11
Modificarea pH-ului amestecului vinasă - zgură de oțelărie - biocărbune la 1,5 unități pH, menținerea la 25°C sub agitare, 20 rpm, timp de 20 min, pentru finalizarea precipitării acizilor humici, preexistenți și formați prin cataliza mediată de oxizii de fier și mangan.	13
Filtrarea amestecului de vinasă - zgură de oțelărie - biocărbune, pe un filtru rotativ cu presiune, 0,6 MPa, cu separarea unui filtrat F1, care este utilizabil ca fertilizant cu conținut ridicat de (glicin)betaină și a unui precipitat P.	15
Amestecarea precipitatului P reținut pe filtru, cu o umiditate reziduală de 20%, cu biocărbune cu umiditate reziduală de 6%, cu rumeguș de lemn de rășinoase cu umiditatea reziduală de 14% și cu omogenizat de drojdie cu umiditate de 85%, în raport de 6 părți precipitat P:44 părți biocărbune:40 părți rumeguș de lemn de conifere:10 părți omogenizat de drojdie, și densificarea amestecului prin presare într-o presă de peleți cu matrițe orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aproximativ 15 mm și diametrul de 5...8 mm, care reprezintă agro-fertilizantul organo-mineral F2.	17
Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:	19
- omogenizarea concentratului de drojdie sub presiune, prin trecere printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, 2 cicluri la 150 MPa și acidifierea omogenizatului la pH 2,0 cu acid fosforic;	21
- zgura de oțelărie, utilizată pentru a cataliza oxidarea acizilor fulvici și coagularea lor în complexe de acizi humici, conține cel puțin 2,5% oxid de mangan și 25% oxizi de fier;	23
- biocărbunele, cu un volum specific microporos, W_o , de cel puțin $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ și cu o suprafață specifică a microporilor, S_{micro} , de minimum $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, este obținut prin piroliza asistată de microunde a unui amestec de borhot de porumb, de la fabricarea alcoolului etilic, și tulei de porumb, 25...50% borhot de porumb, 50...75% tulei de porumb, iar piroliza asistată de microunde se realizează prin expunerea la microunde, cu o putere incidentă de 1000 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, a amestecului borhot de porumb - tulei de porumb;	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49

1 - densificarea amestecului precipitat P: biocărbune: rumeguș de lemn: omogenizat
de drojdie se face la o putere specifică de 1 kW pentru 0,015...0,02 m² suprafață a matricei,
3 cu menținerea temperaturii amestecului de peletizat la circa 65°C.

Procedeul, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

5 - valorifică toți compușii din vinasă, care au valoare biologică ridicată pentru plante,
inclusiv drojdia de fermentație, în agro-fertilizanți organici;

7 - asigură o stabilitate ridicată la păstrare pentru agro-fertilizanții rezultați, în cazul
fertilizantului F1 datorită stabilizării prin reducerea pH-ului și prin înlăturarea unor substanțe
9 organice ușor degradabile, iar în cazul fertilizantului organo-mineral F2 datorită peletizării în
granule cu umiditatea de maximum 15%.

11 - reduce riscurile de mediu asociate melanoidinelor solubile, datorită: (i) humifi-
cării/oxidării, urmată de asocierea în complexe de tip acizi humici, catalizate de oxizii de
13 mangan și fier din zgura de oțelărie, și (ii) fixării în structura spongioasă de biocărbune a
eventualelor melanoidine rămase solubile/incomplet humificate sub acțiunea catalitică a
15 zgurii de oțelărie;

- evită procedeele de stabilizare a vinasei prin tratamente termice de concentrare prin
17 evaporare, energofage și potențial generatoare a unor noi melanoidine solubile;

- în fertilizantul F1 reduce raportul C:N, crescând biodisponibilitatea azotului pentru
19 plante;

- nu implică costuri investiționale foarte semnificative, pentru că nu necesită utilaje
21 dedicate, ci utilaje care sunt folosite în diferite ramuri ale industriilor de proces, și care,
datorită unei piețe diversificate, au costuri de vânzare mai reduse;

23 - permite ridicarea ușoară la scară și procesarea în timp real a unor cantități mari de
vinasă.

25 În continuare, se prezintă un exemplu de realizare care ilustrează invenția fără a o
limita.

27 Exemplu

Din vinasa colectată la distilarea melasei fermentate se separă un concentrat de
29 drojdie, care conține cel puțin 10% drojdie și 2% biocărbune, prin centrifugare pe o centrifugă
continuă de laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1-02-175 (GEA Westfalia
31 Separator Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare
de 10000 rot/min, echivalent a 8500 x g; la o rată de alimentare de 1 l/min, cu separarea con-
33 tinuă a vinasei clarificate și discontinuă a concentratului, ajuns la o densitate de 1100 kg/m³.
Concentratul de drojdie se omogenizează într-un omogenizator cu piston, GEA Niro Soavi
35 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
37 prin liză indusă de variațiile de presiune și trecerea prin valva tip „muchie de cuțit”. Omo-
genizatul de drojdie se răcește, se acidifică la pH 2,0 cu acid fosforic și se menține într-un
39 recipient răcit la 4°C până la utilizare ulterioară.

Într-un vas de reacție de 150 l capacitate totală și 100 l capacitate de lucru, prevăzut
41 cu agitare, se aduc 98 kg de vinasă clarificată, al cărui pH se corectează la valoarea 4, prin
adaos de acid fosforic sau hidroxid de potasiu. Vinasă se aduce la temperatura de 60°C și
43 se adaugă 2 kg zgură de oțelărie. Se menține la 60°C, sub agitare, 20 rot/min, și aerare, 0,2 l
aer/l mediu/min, timp de 12 h, pentru a favoriza catalizarea reacției de humificare de către
45 oxizii de mangan și fier prezenți în zgura de oțelărie.

Zgura de oțelărie utilizată conține cel puțin 2,5% oxid de mangan și 25% oxizi de fier.
47 Conținutul de oxizi de mangan și de oxizi de fier se determină, de exemplu, pe
un spectrometru de fluorescență de raze X cu dispersie după energie, PW 4025 MiniPal
49 (PANalytical, Almelo, Olanda).

Amestecul vinasă clarificată - zgură de oțelărie se răcește la 25°C, pH-ul se modifică la 3,5 și se adaugă 2 kg de bio-cărbune. Se menține, sub agitare, 20 rot/min, timp de 3 h.

Biocărbunele folosit în amestecul de mai sus are un volum specific microporos, W_o , de cel puțin $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, o suprafață specifică a microporilor, S_{micro} , de minimum $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, și este obținut prin piroliza asistată de microunde a unui amestec de borhot de porumb, de la fabricarea alcoolului etilic, și tului de porumb.

Volumul microporos specific, W_o , al bio-cărbunelui activat a fost calculat din partea lineară a funcției Dubinin-Radushkevich (**Stoeckli et al., 2001, Carbon 39: 115-1116**), după determinarea unei izoterme de adsorbție în azot lichid la 77 K, folosind un analizor de fiziosorbție (Micromeritics ASAP 2020, Micromeritics, Norcross, GA, SUA). Suprafața specifică a microporilor a fost estimată raportând valorile obținute pentru volumul microporos specific la dimensiunea medie a porilor (**Stoeckli, 1996, în: Patrick, J. (Ed.), Porosity in Carbons - Characterization and Applications. Arnold, London, pp. 67-92**).

Orice alt tip de (bio)cărbune cu capacități de absorbție a compușilor melanoidinici, care are caracteristicile menționate mai sus, se poate folosi în cadrul acestui exemplu.

Se modifică pH-ului amestecului vinasă - zgură de oțelărie - biocărbune la 1,5 unități pH, se menține la 25°C sub agitare, 20 rot/min, timp de 20 min pentru finalizarea precipitării acizilor humici, preexistenți și formați prin cataliza mediată de oxizii de fier și mangan. Amestecul de vinasă - zgură de oțelărie - biocărbune se separă pe un filtru cu presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen, Sonthofen, Germania), la 0,6 MPa, separându-se un filtrat F1, care este utilizabil ca fertilizant cu conținut ridicat de (glicin)betaină și un precipitat P. 6 kg din precipitatul P reținut pe filtru, cu o umiditate reziduală de 20%, se amestecă într-un malaxor FG3 (Unimec, Siena, Italia) cu 44 kg biocărbune cu umiditate reziduală de 6%, cu 40 kg rumeguș de lemn de confiere, cu umiditatea reziduală de 14% și cu 10 părți omogenizat de drojdie cu umiditate de 85%. Amestecul rezultat se densifică 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 $0,015...0,02 \text{ m}^2$, cu menținerea temperaturii amestecului de pelletizat la circa 65°C, pentru a forma peleți cu lungimea de aproximativ 15 mm și diametrul de 5...8 mm, care reprezintă agro-fertilizantul organo-mineral F2.

În vinasă clarificată prin centrifugare și în filtratul F1 s-au determinat o serie de caracteristici chimice. Materia organică a fost determinată conform SR EN 13039:2012. Pentru a determina acizii humici și fulvici din vinasă și din filtratul F1 au fost prelevate probe care au fost extrase cu pirofosfat de sodiu 0,1 M și hidroxid de sodiu 0,1 M. Supernatantul a fost acidificat la pH 2 cu HCl și menținut 24 h la temperatura camerei. Pentru a separa acizii humici de acizii fulvici, soluția a fost centrifugată, iar precipitatul cu acizi humici a fost dizolvat cu hidroxid de sodiu 2 M (**Yeomans și Bremner, 1988, Comm. Soil Sci. Plant Anal., 19:1467-1476**). Conținutul de carbon în acizii humici și în acizii fulvici a fost determinat prin metoda Sims și Adonis, 1971, Soil Sci., 112:137-141. Fosforul total a fost determinat conform SR EN 13346:2002, azotul total a fost determinat prin metoda Kjeldahl, iar potasiul și sodiul au fost determinați prin flamfotometrie. Conținutul de betaină a fost determinat prin lichid cromatografic de înaltă presiune, conform metodei descrise de **Chendrimada et al., 2002, J. Sci. Food Agric, 82:1556-1563**. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos.

Tabelul 1

Caracteristicile chimice ale vinasei clarificate și ale filtratului F1 (media a trei determinări)

Caracteristică	Vinasă clarificată	Filtrat F1
Materie organică ($\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$)	112,4	82,2
Acizi humici - C ($\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$)	0,6	0,03

Tabelul 1 (continuare)

Caracteristică	Vinasă clarificată	Filtrat F1
Acizi fulvici - C (g.Kg ⁻¹)	21,2	0,6
Azot total (g.Kg ⁻¹)	6,4	5,8
Fosfor (mg.Kg ⁻¹)	6,8	7,4
Potasiu (g.Kg ⁻¹)	12,4	10,5
Sodiu (g.Kg ⁻¹)	5,3	4,8
Betaină (g.Kg ⁻¹)	18,7	16,5

În filtratul F1, rezultat ca urmare a aplicării procedurii descris mai sus, se constată o reducere semnificativă a conținutului de melanoidine, acizi humici și acizi fulvici. Conținutul de betaină se menține ridicat, iar raportul C:N este favorabil acțiunii ca fertilizant cu aport de azot disponibil pentru plante.

În agro-fertilizantul organo-mineral F2 s-au efectuat determinări ale conținutului de acizi humici, folosind metodele prezentate mai sus. Conținutul de acizi humici-C, determinat în agro-fertilizantul F2, este de 15,7 g.kg⁻¹, cu mult peste conținutul de acizi humici determinați în vinasă inițială, rezultat care demonstrează humificarea melanoidinelor de către zgura de oțelărie/oxizii de mangan și fier prezenți în zgură în cadrul procedurii prezentat mai sus.

S-a testat fitotoxicitatea vinasei clarificate și a filtratului F1, folosind biotestul plantulelor de fasole mung (*Vigna radiata*). Boabele de *V. radiata* (cv. *Pusa Bold*) au fost sterilizate la suprafață prin spălări repetate cu hipoclorit de sodiu. Semințele au fost depuse în plăci Petri Ø 25 cm, sterile, pe hârtie de filtru sterilizată, umezită cu câte 10 ml de vinasă clarificată și de filtrat F1. Plăcile Petri au fost menținute la temperatura camerei, timp de 2 săptămâni, după care s-au numărat frunzele formate și s-au efectuat determinări ale lungimii masei umede și masei uscate, pentru tulpina și rădăcina plantulelor. Se constată că, în urma aplicării procedurii și reducerii conținutului de melanoidine solubile, fitotoxicitatea inițială a vinasei clarificate este mult redusă - tabelul 2.

Tabelul 2

Influența aplicării vinasei clarificate și a filtratului F1 asupra plantulelor de fasole mung (Vigna radiata ev. Pusa Bold)

Parametru plantulă	Vinasă clarificată	Filtrat F1
Lungimea tulpinii (cm)	0,68 ± 0,05	5,12 ± 1,28
Lungimea rădăcinii (cm)	1,62 ± 0,83	3,52 ± 0,67
Masa umedă a rădăcinii (mg)	8,12 ± 0,53	93,81 ± 5,12
Masa umedă a tulpinii (mg)	56,32 ± 0,87	116,40 ± 10,78
Masa uscată a rădăcinii (mg)	1,65 ± 0,08	38,71 ± 18,29
Masa uscată a tulpinii (mg)	8,28 ± 0,12	137,83 ± 18,67
Număr de frunze	0,50 ± 0,17	1,97 ± 0,16

S-au realizat determinări ale toxicității pentru organismele acvatice ale vinasei clarificate, ale filtratului F1 și ale unui levigat din fertilizantul organo-mineral F2. S-au efectuat bioteste cu organisme acvatice model, cnidaria *Hydra attenuata*, alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (cunoscută ca *Selenastrum capricornutum*), și

(micro)crustaceele *Daphnia magna* și *Daphnia similis*. Pentru cultivare și determinările (eco)toxicologice pe *P. subcapitata* și *H. attenuata* s-au folosit procedurile descrise de metoda OECD TG201-2006/ISO 8692-2005 [ENV/JM/MONO(2008)28] și, respectiv, **Trottier et al. 1997, Toxicol. Water Qual. 12, 265-271**. Pentru determinările ecotoxicologice cu *D. magna* și *D. similis* s-a folosit metoda OECD TG202-2004/ISO 6341-2005 [ENV/JM/MONO(2008)28]. Toxicitatea a fost estimată prin metoda modificată Spearman-Kärber (**Hamilton et al., 1977, Environ Sci. Techn. 11: 714-719**), folosind o funcție adăugată la Excel Microsoft Office 2010 (Microsoft, Redmont, WA, SUA), și testul Tukey din pachetul software SAS/STAT 12.2. (SA Institute, Carry, NC, SUA), pentru determinarea nivelului de semnificație $P < 0,01$. S-au obținut diverse valori ale EC_{50} , LC_{50} și IC_{50} . Pentru *H. attenuata*, valorile concentrației efective (EC_{50}) au fost calculate pe baza apariției oricăror modificări morfologice și efecte sub-letale pe 50% din populația testată. Pentru *D. Magna* și *D. similis*, concentrația letală (LC_{50}) este concentrația care determină imobilizarea și lipsa la stimuli a 50% din populația de micro-crustacee pe care s-a realizat experimental, iar pentru *P. subcapitata* s-a calculat concentrația inhibitorie (IC_{50}), ca fiind concentrația care inhibă creșterea a 50% din populația testată, comparativ cu un martor netratat.

Levigatul din fertilizantului organo-mineral F2 s-a obținut prin spălarea repetată de cinci ori a 100 g de fertilizant, cu 1 l de apă deionizată.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3 de mai jos.

Tabelul 3

Valorile* IC_{50} , LC_{50} și EC_{50} ale vinasei clarificate, ale filtratului F1 și ale unui levigat fertilizant F2, față de diferite organisme acvatice

Variantă	<i>P. capitata</i> IC_{50}	<i>D. magna</i> LC_{50}	<i>D. similis</i> LC_{50}	<i>H. attenuata</i> EC_{50}
Vinasa clarificată	83	118	233	67
Filtrat F1	1023	1233	1411	1153
Levigat fertilizant F2	6833	7367	7867	6722

*% din mediul de creștere al respectivelor organisme acvatice

Rezultatele demonstrează eficacitatea procedurii propus conform invenției în reducerea toxicității determinate de compuși melanoidinici prezenți în vinasa inițială. Toxicitatea care apare în cazul filtratului F1 este determinată de reducerea pH-ului în mediul de creștere, și nu de compușii melanoidinici. Efectele aparent toxice care au fost evidențiate în cazul levigatului din fertilizantului organo-mineral F2 sunt determinate în principal de lipsa de hrană, rezultată din diluarea excesivă a mediului de cultură, și nu ca urmare a levigării unor compuși melanoidinici toxici.

A fost testată eficacitatea fertilizantului F2 ca osmoprotectant, pentru protecția plantelor de tomate față de stresul hidric. Plantele de tomate (*Lycopersicum esculentum* ev. Cristal F1), răsaduri de 60 zile, au fost transplantate în vase de vegetație de 25 și 50 cm înălțime, în care s-au introdus câte 5 l de substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV). Vasele de vegetație au fost menținute în condiții de seră, la $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul zilei și $17 \pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 h, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$. Experimentul a durat 60 zile. Substratul conținea rezerve de nutrienți

inițiali, astfel încât plantele au fost fertilizate numai o singură dată, după 30 zile de la transplantare, prin aplicarea a 55 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$, Eurofertil, TimacAgro România). Experimentul a fost organizat în bloc randomizat cu câte 4 repetiții pentru fiecare variantă, fiecare repetiție incluzând câte 5 plante. Ca produs de referință a fost folosită glicinetă purificată (99%, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, SUA), variantele testate experimental incluzând și martori tratați cu apă, stresat hidric și nestresat. Tratamentele au implicat aplicarea de soluții de fertilizant 7,5% F1 și glicinetă 10 mM, câte 55 ml/kg de substrat (echivalent a 300 m³/ha, pentru orizontul de sol 0...45 cm), de două ori, o dată ca tratament al substratului de creștere, cu 5 zile înainte de transplantare, și a doua oară după 30 zile, prin includere în soluția nutritivă de îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$), ca soluții de fertilizant 7,5% F1 și glicinetă 10 mM. Variantele experimentale au fost:

V_1 - martor nestresat hidric, tratat cu apă; substrat inițial tratat cu 55 ml apă per kg, echiv. 300 m³/ha, fertilizare 55 ml soluție 1 g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) per kg substrat;

V_2 - martor stresat hidric, tratat cu apă, substrat inițial tratat cu 55 ml apă per kg, echiv. 300 m³/ha, fertilizare soluție 1 g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) per kg substrat;

V_3 - nestresat hidric, tratat cu glicinetă, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 10 mM glicinetă per kg, fertilizare cu 55 ml soluție 1 g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) și 10 mM glicinetă, per kg substrat;

V_4 - stresat hidric, tratat cu glicinetă, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 10 mM glicinetă per, fertilizare cu 55 ml soluție 1 g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) și 10 mM glicinetă, per kg substrat;

V_5 - nestresat hidric, tratat cu fertilizant F1, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 7,5% fertilizant F1, fertilizare cu 55 ml soluție 1 g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) și 7,5% fertilizant F1, per kg substrat;

V_6 - stresat hidric, tratat cu fertilizant F1, substrat inițial tratat cu 55 ml soluție 7,5% fertilizant F1, fertilizare cu 55 ml soluție 1 g/l îngrășământ mineral 20-8-20 ($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$) și 7,5% fertilizant F1, per kg substrat.

Martorul nestresat hidric a fost udat o dată la cinci zile la 100% capacitate de câmp (55 ml/kg substrat), iar variantele stresate hidric au fost udate la 10 zile la 100% capacitate de câmp. La sfârșitul celor 60 zile de la transplantare, s-a desființat experiența, determinându-se parametri morfologici ai plantelor, respectiv înălțimea plantelor și lungimea rădăcinii. Datele au fost prelucrate prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4 de mai jos. Fertilizantul F1, obținut conform exemplului de realizare a invenției, aplicat ca tratament prin udare a solului, în concentrația de 7,5%, respectiv 1,23 g/l glicinetă, are o activitate similară soluției standard de glicinetă purificată, în ceea ce privește limitarea efectelor stresului hidric la plantele de tomate și stimularea plantelor nestresate.

Influența tratamentelor cu compoziții realizate conform invenției asupra plantelor de tomate, stresate și nestresate hidric*

Variantă experimentală	Înălțime plante (cm)	Lungime rădăcini (cm)	Număr frunze	Suprafață frunze (mm ²)	Producție medie** (g fructe coapte/plantă)
V ₁ martor nestresat hidric, tratat cu apă	57,85±1,84a	54,24±3,78ab	32,00±3,1a	672,47±16,21a	307±58,6ab
V ₂ martor stresat hidric, tratat cu apă	44,04±4,42c	38,45±4,27c	25,00±3,2b	527,80±12,93c	202±32,6c
V ₃ nestresat hidric, 2 tratamente glicinbetaină 10 mM	58,30±2,42a	58,50±3,39a	34,00±2,1a	687,58±14,92a	353±28,2a
V ₄ stresat hidric, 2 tratamente glicinbetaină 10 mM	52,50±2,89b	49,80±4,88b	30,00±4,2ab	563,16±15,84b	282±38,6b
V ₅ ne-stresat hidric, 2 tratamente soluție 7,5% fertilizant F1	59,50±3,64a	57,20±2,82a	32,01±2,6a	682,16±8,24a	369±35,6a
V ₆ stresat hidric, 2 tratamente soluție 7,5% fertilizant F1	51,80±2,42b	48,72±4,22b	29,01±3,6ab	572,16±8,24b	279±35,6a

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P > 0,05; **Producția pe 30 zile ciclu de înflorire-fructificare

S-a realizat și un experiment de testare a eficacității agro-fertilizantului organo-mineral F2 în nutriția plantelor ornamentale. S-a lucrat cu butași de mușcată hibridă (*Pelargonium x hortorum*, ev. „Moulin Rouge”). Butașii uniformi ca dezvoltare a rădăcinilor și tulpinii au fost plantați în ghivece de plastic de 25 cm, conținând un substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV). Ghivecele au fost menținute în condiții de seră, la 22 ± 2°C în timpul zilei și 17 ± 2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 h, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 mcE/m²/s, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub 500 mcE/m²/s. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai după trei săptămâni de creștere, prin aplicarea a 55 ml/kg soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 (N-P₂O₅-K₂O, Eurofertil, TimacAgro).

Experimentul de testare a inclus următoarele variante:

V₁ - martor netratat cu agro-fertilizant organo-mineral;

V₂ - martor tratat cu un produs de referință, obținut prin peletizarea în condiții similare a unui amestec de 2 părți zgură de oțelărie, 48 kg biocărbune și 52 kg rumeguș de lemn de conifere, 4 g/kg de substrat, echivalent 21,6 t/ha;

V₃ - tratat cu agrofertilizant organo-mineral F2, 4 g/kg de substrat, echivalent 21,6 t/ha;

V₄ - tratat cu agrofertilizant organo-mineral F2, 6 g/kg de substrat, echivalent 32,4 t/ha.

Fiecare variantă a inclus 12 ghivece, care au fost aranjate în blocuri de câte trei per repetiție, într-o schemă randomizată de tip pătrat latin, 4 variante în 4 repetiții. La 12 săptămâni de la transplantarea butașilor a fost cântărită masa proaspătă și cea uscată a rădăcinilor și a părților aeriene ale plantelor de mușcată. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft).

Tabelul 5

*Efectul tratamentelor cu agro-fertilizant organo-mineral asupra creșterii
plantelor de mușcată*

Variantă experimentală	Masă rădăcină, g		Masă tulpină, g	
	proaspătă	uscată	proaspătă	uscată
V ₁ - martor netratat fertilizanți organo-minerali	13,54b	1,74b	107,16c	14,83c
V ₂ - 4 g/kg substrat produs referință	14,08ab	2,34a	116,41b	16,35b
V ₃ - 4 g/kg fertilizant organo-mineral F2	16,62a	2,45a	128,74a	18,24a
V ₄ - 6 g/kg fertilizant organo-mineral F2	16,68a	2,54a	126,41a	18,35a
DL 5%	172	35	924	107

Rezultatele prezentate în tabelul 5 demonstrează un efect de stimulare a creșterii plantelor ornamentale de mușcată, sub influența tratamentelor cu fertilizant organo-mineral F2.

1. Procedeu de obținere a unui fertilizant din vinasă, **caracterizat prin aceea că** va cuprinde următoarele etape: 3
- separarea unui concentrat de drojdie din vinasă, care conține cel puțin 10% drojdie, prin utilizarea unui separator centrifugal, la minimum 8500 x g, omogenizarea sub presiune a concentratului de drojdie, răcirea omogenizatului și menținerea lui la 4°C; 5
 - aducerea pH-ului vinasei clarificate la valoarea 4 și adăugarea de zgură de oțelărie, în proporție de 2 părți zgură la 98 părți vinasă, și menținerea la 60°C, sub agitare, 20 rot/min, și aerare, 0,2 l aer/l mediu/min, timp de 12 h, pentru a favoriza catalizarea reacției de humificare de către oxizii de mangan și fier prezenți în zgura de oțelărie; 7
 - răcirea amestecului la 25°C, modificarea pH-ului amestecului la 3,5 și adăugarea de biocărbune, în raport de 2 părți biocărbune la 100 părți amestec vinasă - zgură de oțelărie, și menținerea, sub agitare, 20 rot/min, timp de 3 h modificarea pH-ului amestecului vinasă - zgură de oțelărie - biocărbune la 1,5 unități pH, menținerea la 25°C sub agitare, 20 rot/min, timp de 20 min pentru finalizarea precipitării acizilor humici, preexistenți și formați prin cataliza mediată de oxizii de fier și mangan; 9
 - filtrarea amestecului de vinasă - zgură de oțelărie - biocărbune, pe un filtru rotativ cu presiune, 0,6 MPa, cu separarea unui filtrat F1, care este utilizabil ca fertilizant cu conținut ridicat de (glicin)betaină și a unui precipitat P; 11
 - amestecarea precipitatului P reținut pe filtru, cu o umiditate reziduală de 20%, cu biocărbune cu umiditate reziduală de 6%, cu rumeguș de lemn de rășinoase cu umiditatea reziduală de 14% și cu omogenizat de drojdie cu umiditate de 85%, în raport de 6 părți precipitat P:44 părți biocărbune:40 părți rumeguș de lemn de conifere:10 părți omogenizat de drojdie, și densificarea amestecului prin presare într-o presă de peleți cu matrice orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aproximativ 15 mm și diametrul de 5...8 mm, care reprezintă agro-fertilizantul organo-mineral F2. 13
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** omogenizarea concentratului de drojdie are loc sub presiune, prin trecerea printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune, prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, 2 cicluri la 150 MPa și acidifierea omogenizatului la pH 2,0 cu acid fosforic. 15
3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** zgura de oțelărie, utilizată pentru a cataliza oxidarea acizilor fulvici și coagularea lor în complexe de acizi humici, conține cel puțin 2,5% oxid de mangan și 25% oxizi de fier. 17
4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** biocărbunele utilizat, cu un volum specific microporos, W_o , de cel puțin $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ și cu o suprafață specifică a microporilor, S_{micro} , de minimum $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, este obținut prin piroliza asistată de microunde a unui amestec de borhot de porumb de la fabricarea alcoolului etilic, și tulei de porumb, 25...50% borhot de porumb, 50...75% tulei de porumb, iar piroliza asistată de microunde se realizează prin expunerea la microunde, cu o putere incidentă de 1000 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, a amestecului borhot de porumb - tulei de porumb. 19
5. Procedeu conform revendicării, 1 **caracterizat prin aceea că** densificarea amestecului precipitat P: biocărbune:rumeguș de lemn:omogenizat de drojdie se face la o putere specifică de 1 kW pentru 0,015...0,02 m^2 suprafața a matricei, cu menținerea temperaturii amestecului de peletizat la circa 65°C. 21

