



REPÚBLICA ARGENTINA
PODER EJECUTIVO NACIONAL
MINISTERIO DE PRODUCCIÓN

INSTITUTO NACIONAL de la PROPIEDAD INDUSTRIAL

TÍTULO DE PATENTE DE INVENCIÓN

AR090183B1

LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE PATENTES, CONFORME LO RESUELTO EN EL EXPEDIENTE RESPECTIVO Y EN VIRTUD DE LO DISPUESTO POR LA LEY 24.481 (T.O.1996), Y SU DECRETO REGLAMENTARIO (DECRETO 260/96, ANEXO II), EXTIENDE EN NOMBRE DE LA NACIÓN ARGENTINA EL PRESENTE TÍTULO A COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA; UBA. INVENTOR / ES ADALGISA SCOTTI; ALICIA MARGARITA GODEAS; VANESA SILVANI.

QUE ACREDITA LA CONCESIÓN DE PATENTE DE INVENCIÓN SOBRE: PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA CAPACIDAD BIORREMIADORA DE PLANTAS HIPERACUMULADORAS A TRAVÉS DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (HMA) PARA TRATAMIENTO DE SUELOS Y/O AGUAS CONTAMINADOS CUYA DOCUMENTACIÓN ANEXA ES COPIA FIEL DE LA DEPOSITADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL CONFORME A LO ESTABLECIDO EN EL ART. 35 DE LA LEY 24.481 (DECRETO 260/96 - ANEXO I), EL TÉRMINO POR EL QUE SE ACUERDA LA PATENTE ES POR VEINTE AÑOS IMPRORRIGABLES CONTADOS A PARTIR DE LA PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD, POR LO CUAL EXPIRARÁ EL DÍA: 27 DE FEBRERO DE 2033.

BUENOS AIRES, 25 DE FEBRERO DE 2022.



Patentes de Invención
Modelos de Utilidad



Marcas



Modelos y Diseños
Industriales



Transferencia de
Tecnología



Información
Tecnológica

Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

denominada

**“PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA
CAPACIDAD BIORREMEDIADORA DE PLANTAS
HIPERACUMULADORAS A TRAVÉS DE HONGOS
FORMADORES DE MICORRIZAS
ARBUSCULARES (HMA) PARA TRATAMIENTO DE
SUELOS Y/O AGUAS CONTAMINADOS”**

Solicitada por

Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), residente en
Av. del Libertador 8250, Capital Federal, República Argentina.

Universidad de Buenos Aires (UBA), residente en
Viamonte 430 Pb., Capital Federal, República Argentina.

Inventores: Adalgisa Scotti

Alicia Margarita Godeas

Vanesa Silvani

Por el plazo de 20 años

**PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA CAPACIDAD
BIORREMIADORA DE PLANTAS HIPERACUMULADORAS A TRAVÉS
DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (HMA)
PARA TRATAMIENTO DE SUELOS Y/O AGUAS CONTAMINADOS**

La presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la capacidad biorremediadora de plantas hiperacumuladoras a través de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) para tratamiento de suelos y/o aguas contaminados. El procedimiento comprende una planta hiperacumuladora, un hongo formador de micorriza arbuscular y la coenzima metálica zinc (Zn), desarrollados en un sustrato compuesto con cenizas volcánicas, absorbiendo metales pesados y radioisótopos en suelos y aguas contaminadas.

Uno de los problemas señalados por la sociedad a nivel mundial, es la progresiva degradación de los recursos naturales a causa de la gran diversidad de contaminantes tóxicos, orgánicos e inorgánicos en la atmósfera, agua, suelo y subsuelo. Estos compuestos tóxicos pueden tener un origen natural como el desgaste de los cerros o la acumulación de cenizas volcánicas que aportan grandes cantidades de metales pesados al suelo, o bien, un origen antrópico como las infiltraciones de residuos mineros cuyo comportamiento difiere dependiendo de su intercambio con los horizontes del suelo, su pH, potencial de oxidación, cantidad de materia orgánica y sulfuros, entre otros factores.

Según la movilidad relativa que posean los metales pesados pueden estar disponibles en el suelo como iones libres, compuestos de sales metálicas solubles, compuestos insolubles o parcialmente solubles como óxidos, carbonatos e hidróxidos, o bien pueden lixiviarse del perfil del suelo hacia las aguas subterráneas.

La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada de éstos en la cadena alimentaria. Algunos de esos compuestos son más susceptibles a ser fitodisponibles que otros. Se entiende por bioacumulación a la concentración en plantas de un determinado contaminante. Algunos metales pesados (por ejemplo, cobre (Cu), selenio (Se), zinc (Zn)) actúan como elementos traza, ya que son esenciales para mantener

el metabolismo en los seres vivos, y en particular, en el cuerpo humano. Sin embargo, en concentraciones más altas pueden conducir al envenenamiento como se comprueba en los trabajos de Kabata Pendias, A.S. y, Pendias, H. 2000, Mahler, R.L. 2003 y Prieto Mendez, J. et al., 2009, entre otros. Dado que ciertas plantas son capaces de acumular grandes cantidades de contaminantes, se las utiliza en la biorremediación de suelos y aguas (fitorremediación). La fitorremediación de suelos y aguas contaminados es una técnica que utiliza especies vegetales tolerantes a altos niveles de metales pesados. El uso de plantas hiperacumuladoras permite realizar actividades de restauración con un menor impacto ambiental sobre terrenos degradados o contaminados, en comparación con el uso de otras técnicas tradicionales, caracterizadas por ser más invasivas y por producir efectos secundarios adversos.

Hay descritas aproximadamente 400 plantas hiperacumuladoras, pero sólo algunas de ellas son conocidas por sus propiedades fitorremediadoras (*Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Thlaspi caerulescens* y *Fagopyrum esculentem*). La Patente Norteamericana U.S. Pat. No. 5.364.451 presenta el uso de plantas de la familia Brassicaceae en el proceso de remoción de metales tales como plomo y cromo del suelo. Tamura y colaboradores (J. Plant Res., 2005, 118: 355-359) describieron el uso de *F. esculentem* como especie fitorremediadora.

Es conocido en el estado del arte que una lenta tasa de crecimiento y biomasa vegetal son factores que limitan el potencial de las especies hiperacumuladoras en la fitorremediación. Por lo tanto, especies de gran biomasa vegetal, como el tabaco o el girasol, son buenos candidatos para los fines de fitorremediación.

Se han realizado pruebas piloto de fitorremediación con plantas de girasol para la captación de uranio (U) en aguas profundas y superficiales tanto en Chernobyl, Ohio y Fukushima. En este último caso, se buscó contrarrestar el avance de la contaminación nuclear sembrando semillas de girasol, mostaza de campo, amaranto y cresta de gallo, principalmente en plazas y lugares aledaños a la central nuclear.

Por otro lado, los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA) son un grupo de microorganismos importantes del suelo y de las raíces, y se encuentran en la mayoría de los ecosistemas terrestres, incluyendo aquellas áreas contaminadas. Los HMA crecen dentro de las raíces de las plantas, y se los considera una extensión de las mismas por el gran volumen de suelo que exploran a través de su red hifal extra-radical. Entre otros beneficios, los HMA contribuyen en la nutrición de la planta hospedante al incrementar la captación de macronutrientes y micronutrientes (principalmente fósforo (P), y nitrógeno (N), Cu y Zn. Los metales pesados también pueden ser captados por las hifas del HMA y ser transportados hacia la planta vía el micelio. Por lo tanto, las plantas micorrizadas incrementan la entrada de metales pesados (fitoextracción), e incluso el HMA puede contribuir a la inmovilización de dichos compuestos en el suelo debido a la producción de abundante micelio extra-radical (fitoestabilización). Existen diversos trabajos que señalan a la simbiosis micorriza arbuscular (MA) con plantas acumuladoras como buenos sistemas fitorremediadores. La Patente Alemana DE10261705 (A1) (“Process to remove heavy metals from contaminated soil by planting or seeding with plants of the *Thlaspi* variety with Mycorrhiza fungal spores”) presenta la utilidad de la simbiosis MA y la especie vegetal *Thlaspi* para remover metales pesados del suelo, mientras que la Patente China CN102211108 (A) (“Method for repairing petroleum-polluted wetland by combining reed and arbuscular mycorrhiza”) presenta la simbiosis MA con la caña como hospedante para la descontaminación de petróleo.

Las capacidades fitoestabilizadoras y fitoextractoras del girasol en simbiosis MA con el hongo *Rhizophagus intraradices* (Basónimo *Glomus intraradices*) está descrita en el trabajo de Ker y Charest en *Mycorrhiza* (2010) 20:399-406 “Nickel remediation by AM-colonized sunflower” Ker y Charest, en el cuál se investigó el papel de la simbiosis MA establecida con *R. intraradices* y plántulas de girasol en la captación de níquel (Ni) como estrategia de fitoremediación en suelos contaminados. Los mecanismos bioquímicos que intervienen en la captación y tolerancia aún no se han dilucidado. Ker y Charest (2010) demostraron que la simbiosis favorece el metabolismo del nitrógeno y la captación de nutrientes a través del aumento de enzimas como la glutamina

sintetasa; Bathia et al. (2005) comprobaron que la glutamina es el principal aminoácido presente en el xilema de las plantas hiperacumuladoras de Ni, y Saber et al. (1999) observaron la quelación del Zn, cadmio (Cd) y aluminio (Al) a través del malato y citrato.

Como es conocido en el estado del arte, la simbiosis MA participa en la biorremediación de suelos secuestrando metales tóxicos en el tejido fúngico, disminuyendo de esa manera su biodisponibilidad. Dichos resultados también fueron observados por Audet y Charest (2006), Leyval et al. (1997), así como también los resultados reportados por Liu et al. (2000) en el cual mejoran la concentración de Cu, Zn y hierro (Fe) en maíz, los reportados por Chen et al. (2001) para mejorar la captación de P, Cu y Zn en *Trifolium pratense*, y P, potasio (K), Al y Fe en plantas de girasol.

Están descriptos en el estado del arte algunos factores que benefician la fitorremediación. En la Patente Norteamericana U.S. Pat. No. 5917117A se muestran agentes inductores (pH, quelantes, herbicidas) que modifican la capacidad fitorremediadora de las plantas. El desarrollo hace referencia a una mejor acumulación por parte de la planta ante una alta concentración del metal contaminante en suelo.

Los mayores inconvenientes en las técnicas de biorremediación presentes en el estado del arte se encuentran en la baja capacidad de acumulación de metales pesados por las plantas. En la experiencia de Fukushima, la prueba de biorremediación con girasol arrojó bajos porcentajes de acumulación de radioisótopos. Hay varios trabajos donde mencionan que es conveniente extraer una superficie de 2-5 cm de profundidad de suelo contaminado que implementar una experiencia como la del cultivo de girasol.

Disponer de mecanismos de simbiosis, sinergia de metales, estimulación enzimática, etc. que permitan aumentar la capacidad de biorremediación de plantas hiperacumuladoras a través de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) resulta de gran interés para disponer de herramientas de captación de metales en la fitorremediación.

Teniendo en cuenta la posibilidad de biorremediar suelos y aguas contaminadas provenientes de procesos de vulcanismo se incluyó en el diseño

de las investigaciones de la presente invención, la utilización de cenizas volcánicas, resultando también un muy buen sustrato que interviene por diversos mecanismos físico-químicos y biológicos en la captación. La patente 7309437 (Compositions and methods for removal of toxic metals and radionuclides) se refiere al uso de quitina, quitosano, arcilla y ceniza volcánica como único componente o en combinación para la eliminación de metales tóxicos o radionúclidos.

El procedimiento de la invención adiciona Zn, una coenzima metálica bivalente de transición, a la simbiosis MA asociada a la planta bioacumuladora aumentando muy significativamente la extracción de elementos contaminantes. La ventaja del presente desarrollo se debe a la presencia de Zn y los efectos en la capacidad biorremediadora de plantas hiperacumuladoras, aumentando los coeficientes de bioconcentración en plantas hiperacumuladoras micorrizadas.

Las familias vegetales consideradas son: *Asteraceae*, *Gramineae*, y *Brassicaceae*. Los HMA considerados abarcan a las todas las especies que comprenden al phylum Glomeromycota (clase Glomeromycetes, Orden: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales).

El procedimiento biorremediador de la invención comprende una o la combinación de varias plantas hiperacumuladoras, más uno o un consorcio de hongos formadores de micorrizas arbusculares, junto a la coenzima metálica zinc (Zn). Dicha combinación actúa mediante diferentes mecanismos que promueven la bioacumulación y la tolerancia frente a la presencia de metales pesados y radioisótopos. Además de las ventajas mencionadas, es económico, sencillo, no requiere de infraestructura sofisticada, y puede conducir a la comercialización de los propágulos (conjunto de esporas, fragmentos de raíces micorrizadas y micelio) de los HMA adicionados con Zn en forma industrial y/o la venta de plantines de la planta hiperacumuladora previamente micorrizados con el hongo en presencia de Zn.

La aplicación del novedoso procedimiento de la invención son todos los suelos o aguas con presencia de metales contaminantes y radioisótopos. En el caso de suelos contaminados se aplica directamente *in situ*, en el caso de

aguas se puede aplicar en una Planta Depuradora Vegetal (PDV), conocidas en el estado del arte, actuando como un biofiltro.

El ámbito de aplicación es variado y el procedimiento es apto para biorremediar suelos contaminados con zinc (Zn), manganeso (Mn), estroncio (Sr) y uranio (U), como también para radio (Ra), cadmio (Cd), cromo (Cr), selenio (Se), cesio (Cs), cobalto (Co), vanadio (V), molibdeno (Mo), cobre (Cu), arsénico (As), aluminio (Al), berilio (Be), bario (Ba), hierro (Fe), magnesio (mg), mercurio (Hg), plomo (Pb) y níquel (Ni).

En presencia de elevadas concentraciones de Zn, el novedoso procedimiento produce un efecto sinérgico en la captación de metales pesados, por lo que se lo considera un procedimiento biorremediador de suelos y aguas contaminados.

El efecto enzimático promovido por las altas concentraciones de Zn hacen de este procedimiento un completo conjunto de diversos tipos de mecanismos de biorremediación, a saber: fitorremediación (en presencia de la/s planta/s hiperacumuladora/s), remediación a través de microorganismos (por la presencia de HMAs, hongos formadores de micorrizas arbusculares) y remediación enzimática (mediante el rol del Zn).

Las ventajas de la presente invención consisten en la obtención de mayores coeficientes de bioacumulación y una mayor eficiencia.

A fin de una mejor comprensión de la presente invención se explican a continuación las figuras adjuntas las cuales demuestran lo mencionado y que se explican en el ejemplo posterior.

La Figura 1 es una tabla que presenta el efecto de los metales pesados y la suplementación con Zn sobre los parámetros de micorrización y crecimiento de *R. intraradices* (longitud del micelio extra-radical, número de esporas formadas, y porcentaje de colonización micorrízica a partir de las muestras de suelo rizosférico y raíces de *H. annuus*).

La Figura 2 es una tabla que muestra los coeficientes de bioconcentración aérea y radicular, para los tres tratamientos, con y sin MA (+MA, -MA).

La Figura 3 muestra el patrón de colonización micorrízica en raíces colonizadas de *H. annuus* por el HMA *R. intraradices*.

La Figura 4 muestra tricomas de *H. annuus* con Zn, EDS imagen de distribución del Zn en los tricomas y espectro de detección de Zn en muestras tratadas con Au.

La Figura 5 muestra microanálisis de raíces de *H. annuus* con Zn, y espectro de detección de Zn en muestras tratadas con Au.

La Figura 6 muestra el gráfico de bioacumulación de Zn en raíces de *H. annuus* con *R. intraradices* en función de la concentración de Zn.

La Figura 7 muestra el gráfico de bioacumulación de U en raíces de *H. annuus* con *R. intraradices* en función de la concentración de Zn.

La Figura 8 muestra el gráfico de bioconcentración de Zn en raíces con (a) y sin *R. intraradices* (b) respectivamente.

La Figura 9 muestra el gráfico de bioconcentración de Mn en hojas de girasol con (a) y sin MA (b) en función de los tratamientos de Zn 50, 200 y 1000 ppm.

La Figura 10 muestra el gráfico de bioacumulación de Sr en raíces de girasol con (a) y sin MA (b) en función de los tratamientos de Zn 50, 200 y 1000 ppm.

A fin de una mejor comprensión de la presente invención y mayor entendimiento de las ventajas comentadas, a continuación se describe detalladamente la presente invención y un ejemplo preferido de realización.

El procedimiento para aumentar la capacidad biorremediadora de plantas hiperacumuladoras a través de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) propuesto en un ejemplo preferido de realización es *Helianthus annuus* (girasol) - *Rhizophagus intraradices* - zinc desarrollados en un sustrato conteniendo cenizas volcánicas y se puede conducir a la comercialización de los propágulos (conjunto de esporas, fragmentos de raíces micorrizadas y micelio) de los HMA adicionados con Zn en forma industrial y/o la comercialización de plantines de girasol micorrizados con *R. intraradices* en presencia de Zn.

Se inoculan esporas, micelio y fragmentos de raíces colonizadas por el HMA más Zn (en forma de sulfato o cloruro de Zn) en cercanía a la semilla de girasol.

1. Se prepara el sustrato con 50 % de tierra estéril y 50% de cenizas volcánicas.
2. Se adiciona Zn en una concentración que va de un rango de 50 a 1000 ppm de Zn a este sustrato.
3. Se siembran plántulas de *H. annuus* con 2 hojas verdaderas desarrolladas.
4. Las plántulas se inoculan con 5-10 grs. de inóculo general del hongo *R. intraradices* o cepa seleccionada. El inóculo general consta de fragmentos de raíces micorrizadas, micelio y esporas (las cuales son los propágulos o estructuras del hongo). Este inóculo se ubica directamente sobre las raíces de las plántulas, o bien, por debajo de las semillas a 2 cm de la superficie. El hongo formador de micorriza arbuscular es provisto por el Banco de Glomeromycota In Vitro (BGIV, www.bgiv.com.ar, Buenos Aires, Argentina).
5. A los 2 meses de desarrollo en tierra (se alcanza umbral de acumulación) se verifican coeficientes de bioacumulación en parte aérea y radicular (ver Figura 2).

En el desarrollo de la presente invención, el procedimiento es significativamente más eficiente en comparación con la utilización del girasol como único biorremediador en suelos contaminados. Se observa que los porcentajes de colonización radical por *R. intraradices* en presencia de Zn intervienen en la eficiencia del procedimiento. Las plantas colonizadas por un 3% resultaron ser entre un 60 y 80% más eficiente en la captación de metales pesados que aquellas plantas de girasol sin micorrizar (en ausencia del HMA).

Para aquellos casos donde el girasol no pueda cultivarse por razones edafo-climáticas se puede mantener la simbiosis MA establecida por *R. intraradices* u otra especie de HMA (o la combinación de varias) suplementada con Zn y cambiar la especie vegetal por otra o una combinación de especies vegetales que presente una mejor adaptación a la zona a biorremediar, siendo

que los HMA pueden asociarse a más del 80% de las especies vegetales, y son capaces de crecer en diversos ecosistemas terrestres.

En la Figura 1 se puede observar la descripción del efecto del Zn sobre la capacidad biorremediadora de plantas hiperacumuladoras. En ella se registra cuánto se modifica la extensión del micelio en presencia de cantidades variables de Zn, lo cual permite una mayor superficie de exploración del suelo a biorremediar. Los valores representados como la media \pm error estándar de la media (E.S.M) fueron analizados por ANOVA de una vía. Dentro de la fila, las letras distintas difieren significativamente ($p \leq 0,05$) según test de Tukey. La concentración óptima para el desarrollo mayor del micelio extrarradical corresponde a la mayor concentración de Zn que equivale a 1000 ppm.

El análisis microscópico de las raíces colonizadas por el HMA indica la presencia de abundantes vesículas y pocos arbusculos como puede verse en la Figura 3 donde (A) porción de raíz del tratamiento de 50 ppm Zn, (B) 200 ppm Zn, y (D) 1000 ppm Zn; (C) Detalle del micelio intra-radical y vesículas. Barras en A, B y D: 100 μ m; C: 50 μ m.

Se logró detectar claramente los sitios de acumulación del Zn tanto en hojas como en raíces de *H. annuus*, observándose una marcada concentración en tricomas foliares y nódulos de ramificación de raíces, tal como se muestra en la Figura 4.

Como se puede ver en la Figura 2, el mayor coeficiente de bioacumulación para el Zn correspondió a la parte radicular bajo el tratamiento Zn 1000 con micorrización (5,77); para el Mn correspondió a la parte aérea con tratamiento Zn 200 con micorrización (1,87); para el Sr correspondió también a la parte aérea con tratamiento Zn 200 con micorrización (3,75); mientras que para el U correspondió a la parte radicular con tratamiento Zn 1000 con micorrización (0,5). La concentración óptima de Zn para la bioacumulación de Mn y Sr osciló en una media de 200 ppm mientras que para la captación de Zn y U presentó un comportamiento lineal alcanzando los mayores valores de bioacumulación cuando la concentración de Zn oscila en una media de 1000 ppm. En todos los casos se demuestra el efecto positivo de la colonización de *R. intraradices* a *H. annuus*, ya que todos los coeficientes de bioacumulación son mayores en presencia de *R. intraradices* (+MA).

El desarrollo de las estructuras extra-radicales (micelio y esporas) del HMA *R. intraradices* fue afectado en presencia de Zn. A medida que incrementó la concentración de dicho elemento en el sustrato, la longitud del micelio extra-radical incrementó significativamente, mientras que se produjo una inhibición en la esporulación. Esta diferencia en las estructuras extra-radicales se debe a que el hongo invirtió mayor energía y fuentes de carbono hacia la producción del micelio extra-radical que al desarrollo de esporas. Como es conocido en el estado del arte hay una disminución en la cantidad de esporas en suelos contaminados por metales pesados, y por consiguiente, una alteración en el potencial infectivo del inóculo del HMA en el suelo.

La micorrización de las raíces de girasol por la cepa de *R. intraradices* denominada GA5 no se vio afectada ante el incremento del Zn, manteniéndose constante con bajos niveles de colonización entre los distintos tratamientos. Como se sabe, se han reportado repuestas benéficas de la simbiosis MA con tan sólo un 0,4% de colonización radical.

En todos los elementos testeados y los tratamientos se han observado diferencias significativas en la captación de metales cuando las raíces de *H. annuus* estaban colonizadas por *R. intraradices*. Por lo tanto, el HMA está ejerciendo un papel fundamental en la captación y translocación de los metales hacia la planta.

La simbiosis MA establecida entre *H. annuus* - *R. intraradices* aumenta la bioconcentración de Zn, Mn, Sr y U.

Los coeficientes de bioconcentración radicular fueron mayores en los casos con MA.

La mayor bioconcentración radicular de los elementos testeados frente a mayores concentraciones de Zn (tratamientos Zn 200 y Zn 1000) se debe al aumento de la longitud de micelio extra-radical del HMA, y/o al aumento de la actividad enzimática que involucra la acumulación y tolerancia de metales pesados.

Los coeficientes de bioconcentración fueron menores que los encontrados en el ensayo de girasol en hidroponia para la absorción del Zn.

En las Figuras 6, 7 y 8 se demuestra que cuando aumenta el Zn aumenta también la captación de Zn y U radicular y foliar, tanto en plantas micorrizadas como no micorrizadas, mediante una ecuación lineal que responde al rango de 50 a 1000 ppm de Zn, el cual actúa como catalizador tipo coenzima metálico. En las Figuras 9 y 10 se expresan también los gráficos correspondientes para Mn y Sr en hojas y raíces respectivamente, con resultados similares pero en concentración de coenzima metálico (Zn) de 200 ppm para el punto máximo de bioacumulación en los casos de Sr y Mn, en las condiciones de este ejemplo. Es decir que para el Zn y U el comportamiento de la bioacumulación en presencia de Zn se presenta linealmente, mientras que para Mn y Sr se considera una expresión cuadrática con un pico de máxima eficiencia ubicado en 200 ppm de Zn para las condiciones planteadas. En cada caso se expresan las ecuaciones correspondientes.

La pendiente en el caso de raíces micorrizadas es mayor que en el caso de raíces sin micorrizar, indicando mayor capacidad de bioconcentración en presencia de la simbiosis MA.

Siguen 7 reivindicaciones en página 13.

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito y determinado la naturaleza y alcance de la presente invención, y la manera que la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara lo que se reivindica como invención y de propiedad exclusiva:

1) Un procedimiento para aumentar la capacidad biorremediadora de plantas hiperacumuladoras a través de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) para tratamiento de suelos y/o aguas contaminados con metales pesados y radioisótopos, excluidas dichas plantas, excluidas las semillas y las plántulas de dichas plantas y excluidos dichos hongos involucrados en el procedimiento, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

1. Preparar un sustrato con al menos un 50% V/V de suelo, y el resto con cenizas volcánicas hasta completar el 100% V/V;
2. Adicionar entre 50 y 1000 ppm de Zn a dicho sustrato;
3. Sembrar en dicho sustrato una o más plantas hiperacumuladoras pertenecientes a las familias Asteraceae, Gramineae o Brassicaceae;
4. Inocular dichas plantas hiperacumuladoras con 5 a 10 gramos de fragmentos de raíces micorrizadas, micelio y esporas de al menos un hongo formador de micorrizas arbusculares (HMA) pertenecientes a la división Glomeromycota;
5. Regar a dichas plantas con un volumen de agua apropiado para su crecimiento normal; y
6. Medir los coeficientes de bioacumulación en parte aérea y radicular de dichas plantas hasta alcanzar su punto máximo, y remover la biomasa vegetal.

2) El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque:

- en el paso 1, dicho sustrato se realiza con suelo contaminado;
- en el paso 3, dichas plantas hiperacumuladoras se encuentran en estado de plántula;
- en el paso 4, dicha inoculación se realiza sobre las raíces de dichas plantas hiperacumuladoras; y
- en el paso 5, dicho riego se realiza con agua limpia.

3) El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque:

- en el paso 1, dicho sustrato se realiza con suelo contaminado;
- en el paso 3, dichas plantas hiperacumuladoras se encuentran en estado latente de semilla;

- en el paso 4, dicha inoculación se realiza por debajo de dichas semillas de dichas plantas hiperacumuladoras a una distancia que permita la colonización radicular; y
 - en el paso 5, dicho riego se realiza con agua limpia.
- 4) El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque:
- en el paso 1, dicho sustrato se realiza con suelo limpio;
 - en el paso 3, dichas plantas hiperacumuladoras se encuentran en estado de plántula;
 - en el paso 4, dicha inoculación se realiza sobre las raíces de dichas plantas hiperacumuladoras; y
 - en el paso 5, dicho riego se realiza con agua contaminada.
- 5) El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque:
- en el paso 1, dicho sustrato se realiza con suelo limpio;
 - en el paso 3, dichas plantas hiperacumuladoras se encuentran en estado latente de semilla;
 - en el paso 4, dicha inoculación se realiza por debajo de dichas semillas de dichas plantas hiperacumuladoras a una distancia que permita la colonización radicular; y
 - en el paso 5, dicho riego se realiza con agua contaminada.
- 6) El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dichas plantas hiperacumuladoras son preferentemente *Helianthus annuus* (girasol).
- 7) El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dichos hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) son preferentemente *Rhizophagus intraradices*.

Ing. Edgardo Sergio ALANIZ

Agente de la Propiedad Industrial

Matrícula N° 2282

Parámetro	Inoculación con Zn		
	50ppm Zn	200ppm Zn	1000ppm Zn
Longitud de micelio extra-radical (cm.)	33,50±11,01a	187,50±11,01b	334,17±9,26c
No. esporas extra-radicales	1±0,68a	2,83±1,64a	0,83±0,83a
Colonización micorrízica (%)	9,83±2,54a	8,67±3,89a	3,33±0,76a

Figura 1

	Tratamiento 50 Zn				Tratamiento 200 Zn				Tratamiento 1000 Zn			
	CBA		CBR		CBA		CBR		CBA		CBR	
	+MA	-MA.	+MA	-MA.	+MA	-MA.	+MA	-MA.	+MA	-MA.	+MA	-MA.
Zn	0,38	0,38	0,53	0,19	0,82	0,64	3,82	2,71	3,04	2,65	5,77	2,46
Mn	1,32	0,86	0,75	0,28	1,87	1,41	1,15	0,73	1,81	1,46	0,98	0,55
Sr	3,62	3,25	1,75	1	3,75	3,62	0,63	1,75	3,12	0,12	2	1,25
U	0,25	0,19	0,31	0,25	0,39	0,43	0,22	0,09	0,15	0,06	0,5	0,25

Figura 2

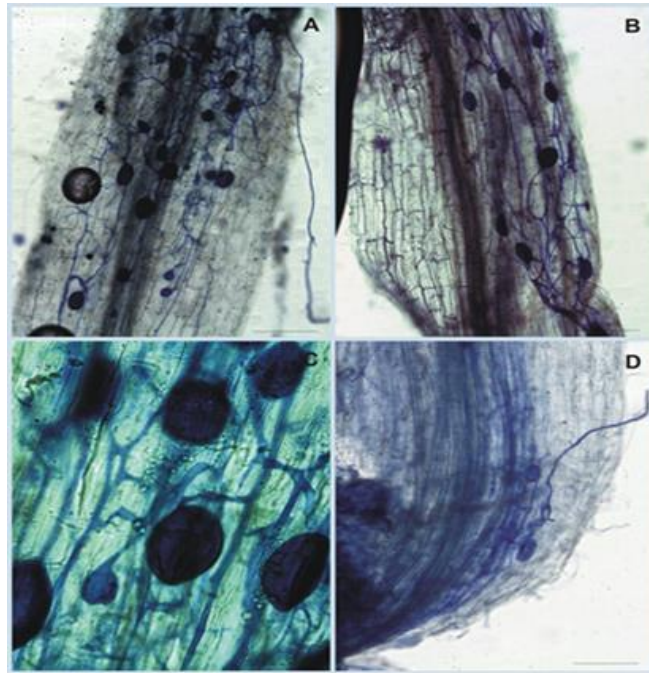


Figura 3

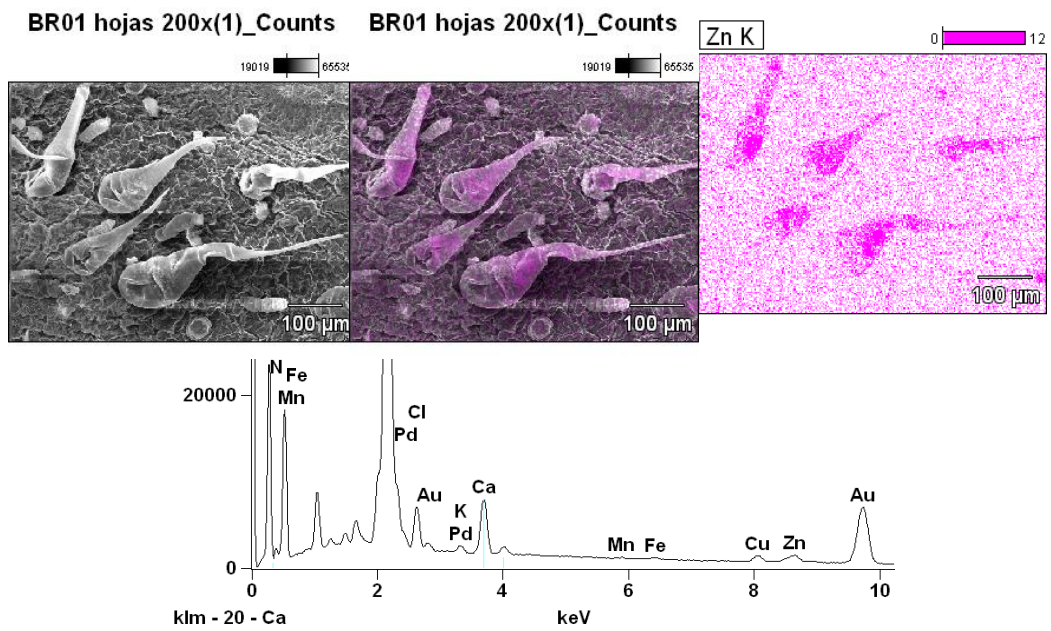


Figura 4

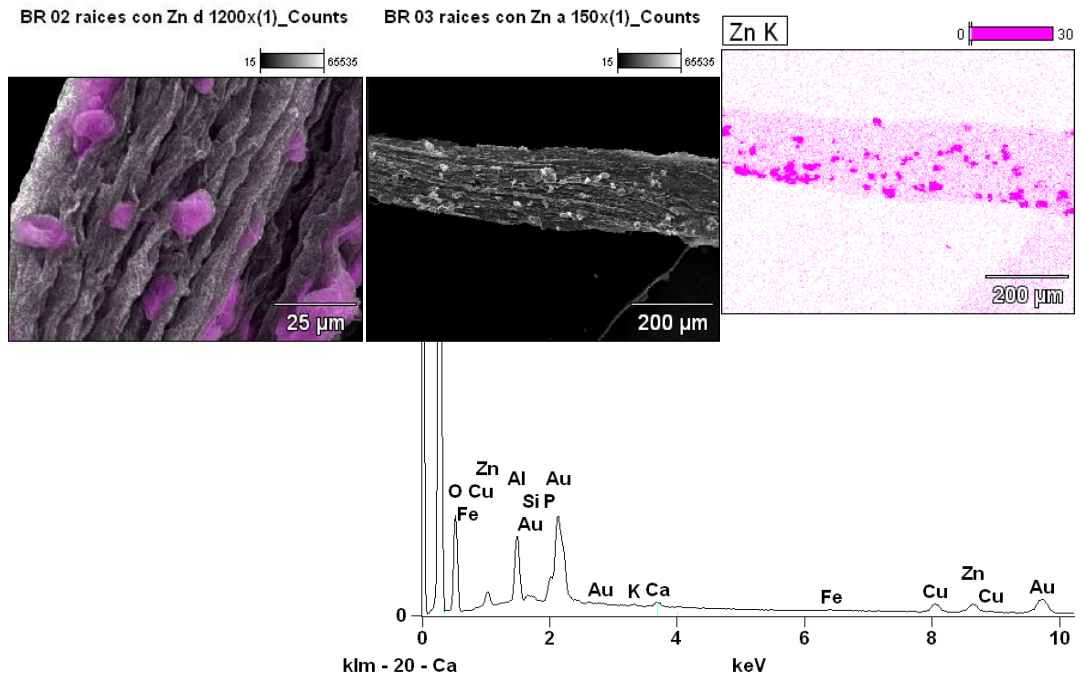


Figura 5

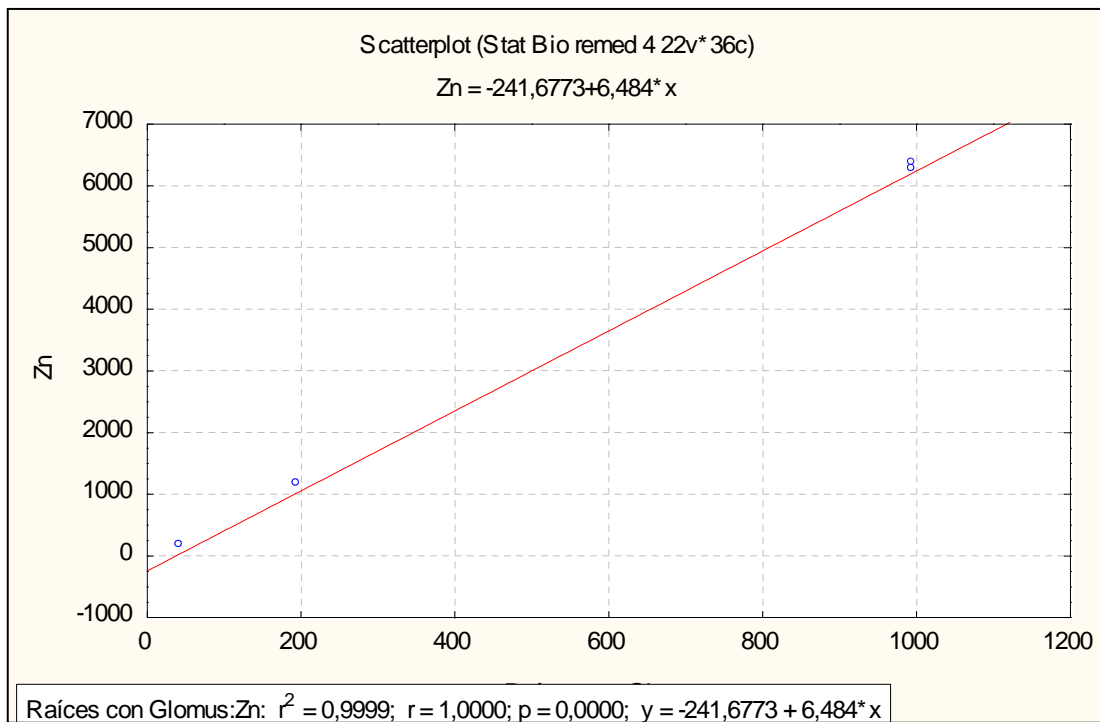


Figura 6

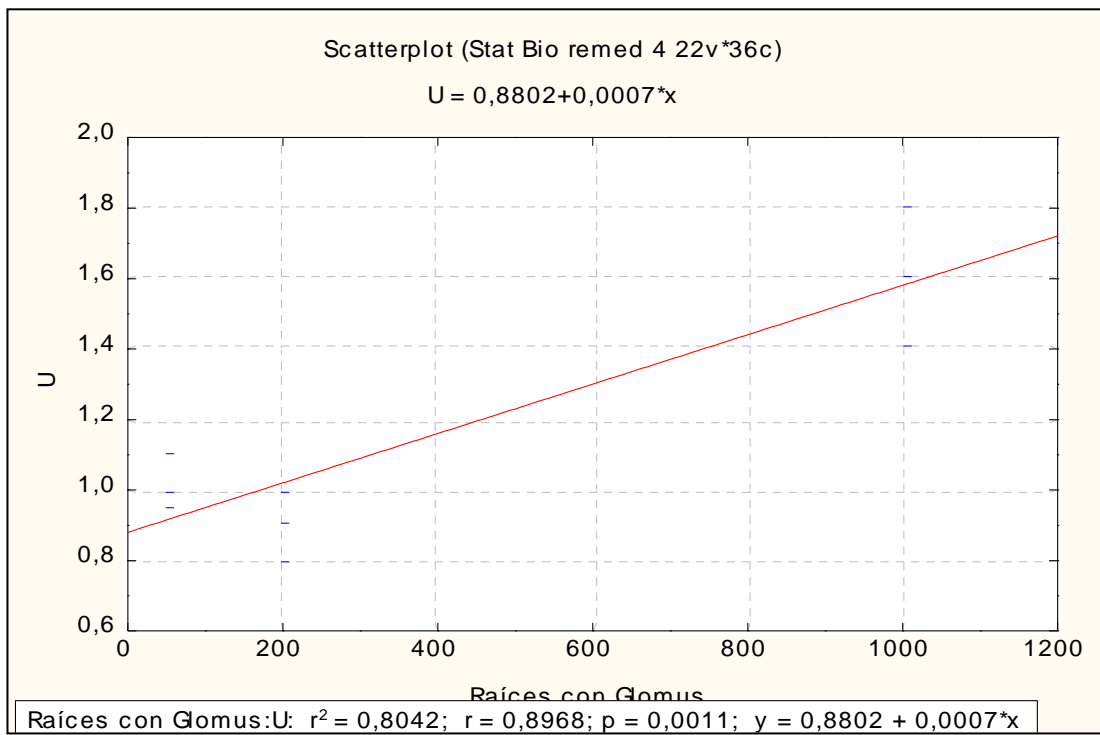


Figura 7

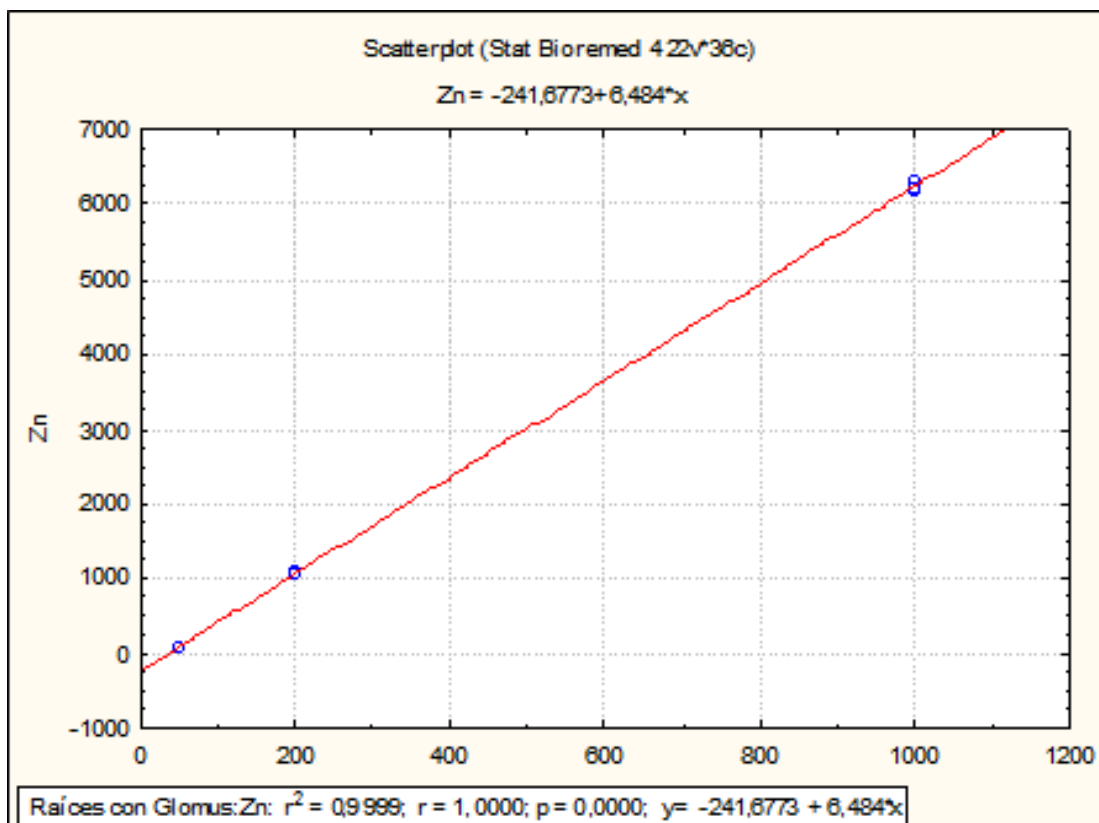


Figura 8 (a)

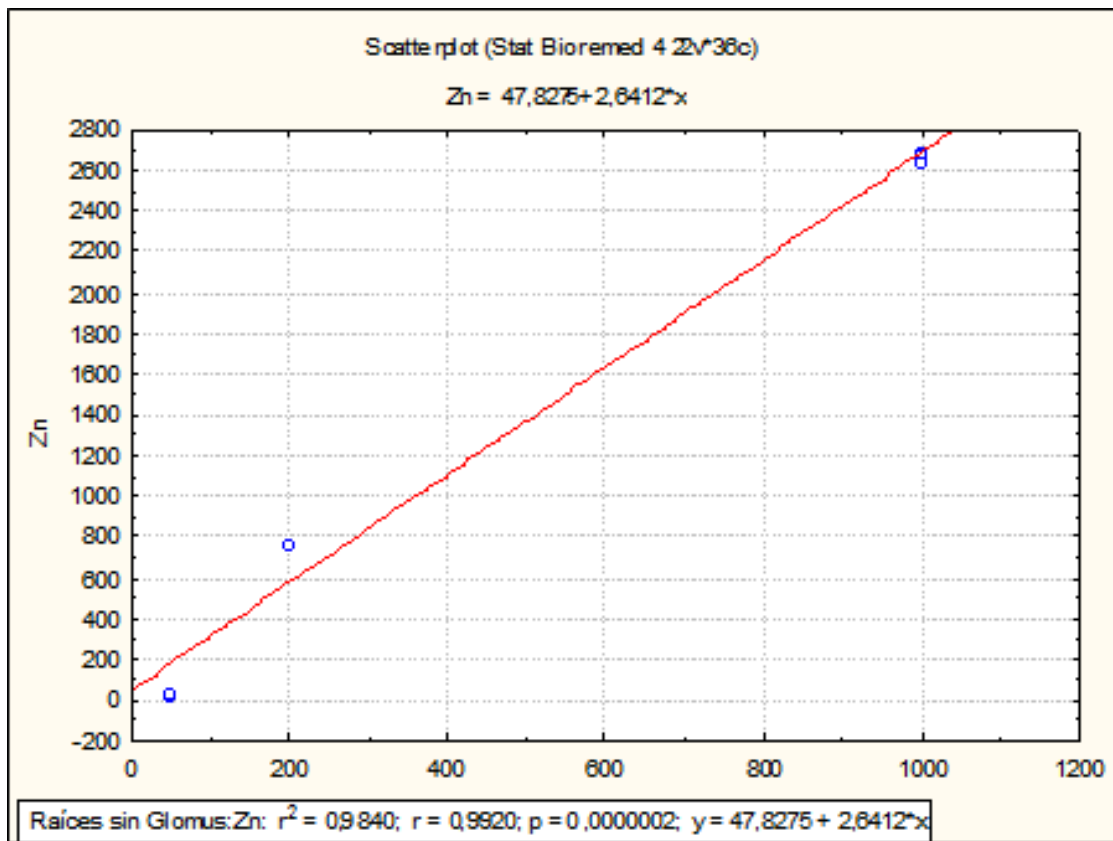


Figura 8 (b)

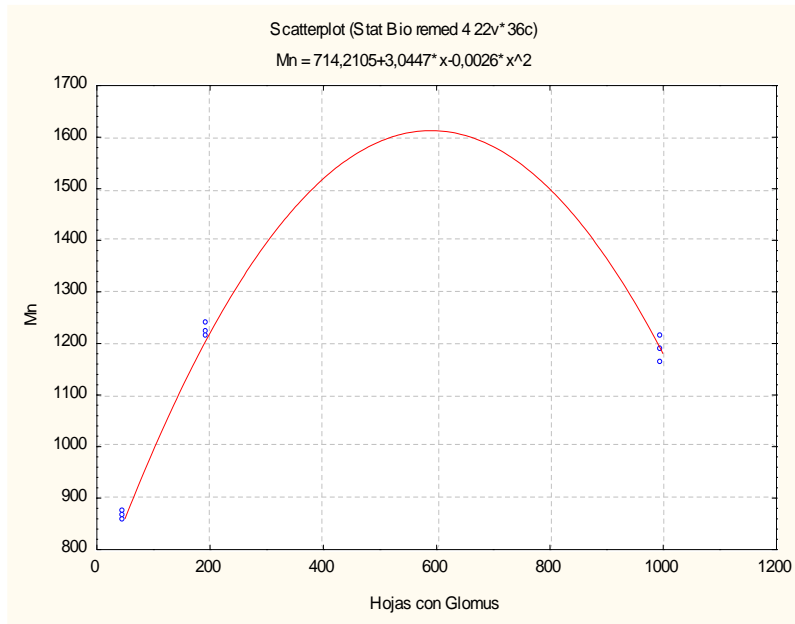


Figura 9 (a)

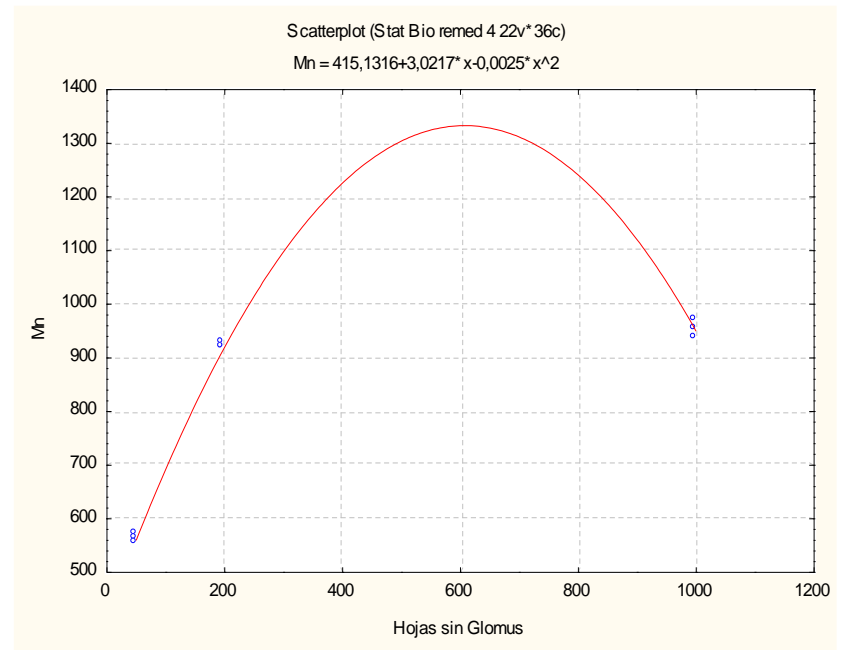


Figura 9 (b)

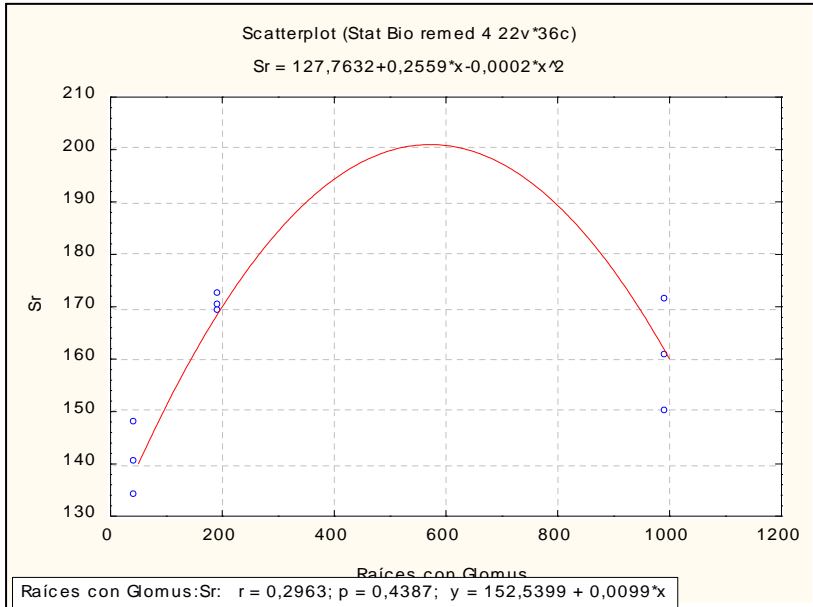


Figura 10 (a)



Figura 10 (b)

RESUMEN

Un procedimiento para aumentar la capacidad biorremediadora de plantas hiperacumuladoras a través de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) para tratamiento de suelos y/o aguas contaminados. El procedimiento comprende una planta hiperacumuladora, un hongo formador de micorrizas arbusculares y la coenzima metálica zinc (Zn), desarrollados en un sustrato compuesto con cenizas volcánicas, absorbiendo metales pesados y radiosótopos en suelos y aguas contaminados.

A causa de la contaminación de suelos y aguas por metales pesados resulta de interés disponer de mecanismos de simbiosis, sinergia de metales, estimulación enzimática, etc., que permitan aumentar la capacidad de biorremediación de plantas hiperacumuladoras a través de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) para disponer como herramientas de captación de metales en la fitorremediación.

Las ventajas de la presente invención consisten en la obtención de mayores coeficientes de bioacumulación y una mayor eficiencia de la capacidad de biorremediación de plantas hiperacumuladoras.

PRIMERA REIVINDICACIÓN

Habiendo descrito y determinado la naturaleza y alcance de la presente invención, y la manera que la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara lo que se reivindica como invención y de propiedad exclusiva:

1) Un procedimiento para aumentar la capacidad biorremediadora de plantas hiperacumuladoras a través de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) para tratamiento de suelos y/o aguas contaminados con metales pesados y radioisótopos, excluidas dichas plantas, excluidas las semillas y las plántulas de dichas plantas y excluidos dichos hongos involucrados en el procedimiento, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

1. Preparar un sustrato con al menos un 50% V/V de suelo, y el resto con cenizas volcánicas hasta completar el 100% V/V;
2. Adicionar entre 50 y 1000 ppm de Zn a dicho sustrato;
3. Sembrar en dicho sustrato una o más plantas hiperacumuladoras pertenecientes a las familias Asteraceae, Gramineae o Brassicaceae;
4. Inocular dichas plantas hiperacumuladoras con 5 a 10 gramos de fragmentos de raíces micorrizadas, micelio y esporas de al menos un hongo formador de micorrizas arbusculares (HMA) pertenecientes a la división Glomeromycota;
5. Regar a dichas plantas con un volumen de agua apropiado para su crecimiento normal; y
6. Medir los coeficientes de bioacumulación en parte aérea y radicular de dichas plantas hasta alcanzar su punto máximo, y remover la biomasa vegetal.

Continúan 6 reivindicaciones.



REPÚBLICA ARGENTINA

(10) PATENTE DE INVENCION

(11) RESOLUCION NUMERO: AR090183B1

(--) DISPOSICION GDE NUMERO: DI-2022-73-APN-ANP#INPI

(24) FECHA DE RESOLUCION: 25/02/2022

(--) FECHA DE VENCIMIENTO: 27/02/2033

(21) ACTA NUMERO: P20130100620

(22) FECHA PRESENTACION:27/02/2013

(51) INT.CL.7 : B09C 1/10, C02F 3/32

(30) PRIORIDAD CONVENIO DE PARIS

(54) TITULO :PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA CAPACIDAD BIORREMIADORA DE PLANTAS HIPERACUMULADORAS A TRAVES DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (HMA) PARA TRATAMIENTO DE SUELOS Y/O AGUAS CONTAMINADOS

(71) TITULAR :

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
UBA

---- CON RESIDENCIA EN :

AVDA. DEL LIBERTADOR 8250 1429 C.A. DE BS. AS., País AR
VIAMONTE 430 CABA, (1053), País AR

(74) AGENTE :2282