



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00915**

(22) Data de depozit: **19/09/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **26/02/2016** BOPI nr. **2/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2013 BOPI nr. **7/2013**

(73) Titular:

- **BIOING S.A., STR.PROF.ION BOGDAN NR.10, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **ICHIM MARIA, STR.HUȘI NR.7, BL.PA 1, SC.2, ET.3, AP.26, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **DIACONESCU CRISTIANA, STR.ATELIERELE NOI NR.43, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **TĂNASE DOINA, STR.MIHĂILESCU VINTILĂ NR.19, BL.62, SC.2, AP.71, ET.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **URDES LAURA, STR.CPT.OCTAV COCĂRĂSCU NR.45 A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **BRĂILOIU CRISTIAN, STR.ȘARADEI NR.103, AP.5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **POPA DANA, STR.GÂRLeni NR.2, BL.C 86, AP.35, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **VIȘAN ADRIANA, STR.FELEACU NR.6, BL.10 I, SC.2, ET.2, AP.21, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ICHIM LIVIU-IONEL, STR.HUȘI NR.7, BL.PA 1, SC.2, ET.3, AP.26, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ENACHE RAMONA, STR.APUSULUI NR.26-28, BL.N 29, SC.2, ET.4, AP.37, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

MARIA ICHIM & COLAB.
"PHYTOREMEDIATION OF LEAD CONTAMINATED SOILS", THE 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOTECHNOLOGY, SCIENTIFIC PAPERS, SERIA F, -SUPPLEMENTARY VOLUME-, PP. 217-223, BUCHAREST, 2010;
RO a 2005 00455 A2

(54) **PROCEDEU DE FITOREMEDIERE A SOLURILOR CONTAMINATE CU PLUMB, UTILIZÂND HIBRIZI DE DUD - MORUS SP., INOCULAȚI CU ENDOMICORIZE DE TIP VEZICULAR-ARBUSCULAR**



1 Invenția se referă la un procedeu de fitoremediere a solurilor contaminate cu plumb,
2 prin utilizarea hibrizilor de dud *Morus sp.* inoculați cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular,
3 valorificând astfel aceste soluri pentru sericicultură.

4 Este cunoscut că măsurătorile anterioare, privind poluarea solurilor în România
5 (realizate înainte de 1989), au arătat că aproximativ 900000 ha au fost afectate în mod diferit
6 de diverse tipuri de poluanți.

7 În cadrul Sistemului Național de Monitorizare a Poluării au fost identificate 5 tipuri de
8 poluare, dintre care de interes pentru tematica brevetului este poluarea produsă de reziduuri
9 și deșeuri anorganice formate din minerale, materii anorganice, metale, săruri, acizi și baze.

10 În zonele Baia Mare, Copșa Mică, Zlatna, Turnu Măgurele și Valea Călugărească sunt
11 afectate peste 185000 ha prin poluare cu metale grele și emisii de SO₂, solurile suferind și
12 de acidifiere, iar suprafața totală poluată fiind de peste 319000 ha, din care aproximativ 42600
13 ha sunt grav afectate.

14 Metalele grele sunt elemente chimice comune tuturor solurilor, iar abundența lor se
15 situează între domeniul procentelor (fier) și cel al miligramelor per kilogram sol. Nivelul normal
16 foarte redus din sol și plantă, precum și rolul fiziologic al unora dintre aceste elemente chimice
17 au condus la gruparea lor sub titlul generic de "microelemente".

18 În accepțiunea chimiștilor și a cercetătorilor din domeniul mediului înconjurător,
19 metalele grele reprezintă acele elemente chimice cu caracter metalic, cu greutatea specifică
20 mai mare decât 5. În această grupă sunt cuprinse următoarele elemente chimice: fierul,
21 manganul, cadmiul, cobaltul, cromul, cuprul, nichelul, mercurul, plumbul, zincul, vanadiul.
22 Unele dintre aceste elemente chimice, precum cadmiul, mercurul și plumbul, au caracter
23 semnificativ de toxicitate, iar altele, în cantități reduse, au însușiri nutritive, contribuind la o
24 serie de procese biochimice pe parcursul creșterii și dezvoltării plantelor.

25 Din această categorie fac parte: fierul, manganul, cuprul, zincul. Numai atunci când
26 absorbția lor se realizează la intensități ridicate, aceste elemente chimice au efect negativ
27 asupra creșterii și dezvoltării plantelor.

28 În anumite areale, conținutul acestor elemente chimice din soluri este mai mare decât
29 limita maximă a intervalului de concentrație în care efectul lor asupra vegetației este benefic
30 sau nedăunător. Se ajunge astfel în situația ca elementele chimice în cauză să contribuie la
31 inhibarea nu numai a procesului normal de creștere și dezvoltare a plantelor, ci și la dereglarea
32 funcționalității celorlalte componente ale mediului înconjurător. Cauza acestor conținuturi
33 foarte mari din sol poate fi de natură geogenă, dar mai ales de natură antropogenă.

34 În această situație, a conținuturilor foarte mari de astfel de elemente chimice, se
35 utilizează noțiunea de "metal greu", plumbul făcând parte din această categorie, iar LMA este
36 4 mg/1000 g sol.

37 Intensitatea efectului negativ al metalelor grele este dependentă atât de mărimea
38 concentrației lor, cât și de o serie de însușiri fizice și chimice definitorii ale solurilor, precum
39 textura, conținutul de materie organică, potențialul redox etc.

40 La Copșa Mică și Baia Mare poluantul specific de interes a fost plumbul din pulberile
41 în suspensie, concentrațiile fiind comparate cu cele determinate în zona Mediaș și Zlatna.

42 Valorile frecvențelor de depășire ale CMA (%), însemnând concentrația maximă
43 admisibilă, pentru plumb este de 57,33% reprezentând 0,017 mg/m³ sol la Baia Mare, și de
44 70,29%, reprezentând 0,020 mg/m³ sol la Copșa Mică.

45 Fitoremedierea este utilizată pentru depoluarea solurilor contaminate cu metale grele,
46 și se bazează în general pe capacitatea plantelor hiperacumulatoare de metale grele în
47 rădăcini, lăstari sau tulpini.

Eficiența fitoremedierii este dependentă de caracteristicile plantelor, cum ar fi: ritmul de creștere, productivitate ridicată de biomasă, recoltare facilă și toleranță la acumularea unui număr mare de metale grele. Două tipuri de plante sunt în mod curent utilizate în fitoremediere. Primul tip sunt plante care, în mod natural, sunt hiperacumulatori de metale grele, iar al doilea tip sunt plante tolerante pentru concentrații ridicate de metale grele în soluri, și care, prin biotehnologii specifice, pot decontamina solurile poluate.	1 3 5
Plantele de dud, aparținând genului <i>Morus sp.</i> , sunt considerate plante cu importanță economică pentru sericicultură, frunza de dud constituind unica sursă de hrană a viermilor de mătase din specia <i>Bombyx mori</i> . Din punct de vedere botanic, plantele de dud aparțin diferitelor specii din genul <i>Morus</i> , fiind plante unisexuat dioice, înmulțite pe cale vegetativă sau sexuată.	7 9 11
Din literatura de specialitate este cunoscut faptul că rădăcinile plantelor <i>Morus sp.</i> sunt componente esențiale ale productivității și stabilității ecosistemelor, fiind capabile să sintetizeze o diversitate remarcabilă de metaboliți secundari, și să-și adapteze activitățile metabolice ca răspuns la factorii abiotici de stres.	13 15
Plantele <i>Morus sp.</i> sunt ideale în fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb deoarece au creștere rapidă și produc o cantitate mare de biomasă, în timp ce acumulează concentrații crescute de plumb.	17
Pentru îmbunătățirea parametrilor bioproductivi ai vitroplantulelor de dud, s-a luat în considerare biofertilizarea acestora cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular, rezultatele fiind extrem de încurajatoare pentru cultura dudului în România pe solurile contaminate cu plumb.	19 21
Efectul major al simbiozelor micorizale asupra plantelor gazdă constă din creșterea aportului de elemente minerale, în special al celor care, în stare ionică, prezintă o mobilitate redusă, ori care sunt prezente în concentrații suboptimale (fosfor, amoniu, zinc, cupru, inclusiv contaminanți precum plumbul).	23 25
Potențialul biosintetic al rădăcinilor de la dud este puțin studiat pe plan mondial, fapt ce evidențiază importanța cercetărilor inițiate pe plan național, privind stabilirea de clone în condiții <i>in vitro</i> și experimentarea biofertilizării cu endomicorize vezicular-arbusculare a vitroplantulelor și a plantulelor de dud.	27 29
Combinarea efectului fungilor de micorize asupra ecosistemului plantă-sol la hibridii de dud creează premisa utilizării cu succes a acestora în fitoremediere, ce are ca scop utilizarea acestor plante pentru detoxifierea mediului poluat, ca abordare biotehnologică de mare perspectivă.	31 33
Maria Ichim & colab. în “Phytoremediation of lead contaminated soils”, The 3rd International Symposium of Biotechnology, Bucharest, 2010, Scientific papers, seria F, Supplementary Volume, pp. 217-223, descrie câteva modele de plantații de specii aparținând genului <i>Morus</i> . În procesul de fitoremediere, metalele sunt extrase din sol de către plante din genul <i>Morus</i> având un potențial ridicat în acest sens. Fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb se realizează prin utilizarea potențialului de fitoremediere al plantelor lemnoase din genul <i>Morus</i> . Pentru a evidenția procesele de absorbție, acumulare și translocare a plumbului au fost dezvoltate, în condiții experimentale, trei modele de plantare: un model de plantare pantă, un model de plantare de formă dreptunghiulară sau formă pătrată, și un model de plantare într-un triunghi neregulat, fiind stabilite proporțiile între rânduri, dimensiuni, precum distanțele dintre arborii plantați.	35 37 39 41 43 45
RO a 2005 00455 A2 se referă la o metodă de fitoremediere a solurilor poluate cu plumb. Metoda conform invenției constă în tratarea solului poluat cu 1000...3000 mg Pb/kg sol uscat cu un agent de mobilizare a plumbului, ales din clasa acidului etilendiaminotetraacetic	47

(EDTA), la un raport molar agent de mobilizare:plumb de 0,5:2, și cultivarea pe respectivul sol a plantei de porumb în care conținutul de plumb, după recoltare, a fost cuprins în intervalul 1...4,93%.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb, pentru reintroducerea lor în circuitul agricol.

Procedeul de fitoremediere a solurilor contaminate cu plumb, prin utilizarea hibrizilor de dud *Morus sp.* inoculați cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular pentru minimum 15% din biomasa radiculară, conform invenției, constă în aceea că se înființează plantații cu densitate de peste 16600 plante la hectar, în sistemul de cultură cu rânduri duble, cu distanțele de plantare de 2,5 x 0,5 x 0,5 m, cu intervale de exploatare tehnologică alternativă a culturilor intercalate cu graminee perene, destinate înmulțirii rândurilor de dud, plantații exploatare pentru creșterea viermilor de mătase *Bombyx mori* începând cu anul 3 de la înființarea plantațiilor, producția de gogoși de mătase fiind destinată industriei textile; după o perioadă de exploatare a acestor plantații de 10...20 ani, terenurile pot fi redat circuitului agricol, după controlul nivelului de contaminare, pentru alte culturi agricole.

Materialul săditor de dud, format din hibrizi de dud fertilizați cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular, prezintă o rezistență sporită la agenții patogeni specifici, iar sistemul lor radicular permite o mobilizare și absorbție mai bună a macro- și microelementelor din sol, inclusiv a unor metale grele imobilizate în particulele de sol, realizând astfel și decontaminarea solurilor la nivele optime de conținut.

Cercetările recente au abordat aspecte privind fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb, prin înființarea unor plantații de dud cu destinație sericicolă, care permit valorificarea economică a acestora, prin obținerea unor gogoși de mătase destinate industriei textile.

Cercetările efectuate au condus la utilizarea unui material săditor de dud, cu efect fitoremediator al solurilor contaminate cu plumb.

Se dă, în continuare, un exemplu concret de realizare a invenției.

Obținerea inoculilor endomicorizați, de tip vezicular-arbuscular, se realizează procedând astfel pentru inoculul brut:

În parcelele cultivate cu porumb sau ceapă se recoltează biomasa radiculară a plantelor, aceasta urmând a fi condiționată prin mărunțirea materialului vegetal pe o adâncime a solului de 20...30 cm, inclusiv a particulelor de sol aderente, folosind o moară cu ciocănele, și omogenizare cu ajutorul unui melc transportor. Perioada optimă pentru recoltarea biomasei radiculare este în fenofaza de postrecoltare a producției principale. Inoculul brut astfel obținut se păstrează în condiții de depozitare cu umiditate relativă a aerului de maximum 60%, fără pericol de mucegai sau de rozătoare. Forma de prezentare poate fi vrac sau în saci de 50 kg.

Utilizarea biomasei radiculare de porumb sau ceapă asigură un inocul brut de endomicorize de tip vezicular-arbuscular sigur, dar pentru control, înainte de utilizare, se procedează la caracterizarea acestuia prin metoda de colorare Trypan blue.

Realizarea hibrizilor de dud inoculați cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular și repicarea acestora cuprind lucrările de obținere a substratului de repicare format din pământ de țelină, mraniță și nisip, în proporții egale, ce se sterilizează prin autoclavizare la temperatura de 110°C, timp de 60 min, după răcire fiind amestecat cu inoculul brut în doză de 100 g/1000 g amestec de substrat, sau în doză de 25 mg inocul comercial/1000 g de substrat. Biofertilizantii comerciali conțin floră activă și linii selectate ale fungilor de *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* și *Sclerocystis sp.* Pământul de țelină utilizat în obținerea stratului

de repicare poate proveni din arealele contaminate, în cazul în care concentrația formelor	1
de plumb din sol este mai mică de 0,04% în soluția solului. Când concentrația este mai mare,	
pământul de țelină trebuie procurat din zone necontaminate.	3
Substratul de repicare inoculat astfel obținut se modelează sub formă de brazde cu	
lățimea de 60 cm și înălțimea de 40 cm. În brazdele astfel modelate sunt semănate	5
semințele de dud, pregerminate timp de 48 h în apă de robinet. Semănatul se realizează în	
două rânduri paralele, de-a lungul brazdei, la o distanță de 20 cm, la o adâncime de 1...1,5	7
cm, utilizând 5 g de sămânță pe 1 m ² suprafață. Pentru uniformizarea semănatului se	
folosește amestecarea seminței cu nisip în proporție de 1:10, semințele fiind acoperite cu	9
nisip și mranită. Lucrările de întreținere în perioada de vegetație constau din plivitul	
buruienilor de câte ori este necesar, și irigarea în picătură a brazdelor cu plantulele de dud.	11
La sfârșitul perioadei de vegetație se execută recoltarea hibrizilor de dud și stratificarea	
acestora. În această etapă se realizează următoarele activități:	13
- controlul colonizării și selecția hibrizilor de dud inoculați - se realizează prin	
aplicarea metodei de colorare cu Trypan blue;	15
- controlul și selecția hibrizilor de dud inoculați prin această metodă - se aplică prin	
control randomizat al puieților de dud recoltați din câmpul de semănare la un număr de	17
10 plante/1000 hibrizi de dud.	
Puieții de dud necolonizați se vor suprainocula prin administrarea inoculului brut sau	19
comercial, în dozele menționate, individual, odată cu plantatul, toate plantele urmând a fi	
udate zilnic timp de 7 zile după repicare în zona radiculară, iar udările următoare devenind	21
săptămânale. Suprainocularea se poate repeta de cel mult 3 ori până la sfârșitul perioadei	
de vegetație.	23
Hibrizii de dud prezintă caracteristici genetice heterozigotice și fenotipice diverse.	
Biofertilizarea cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular prezintă rezultate privind	25
colonizarea ce depinde de bicompatibilitatea cu fungii componenți ai inoculilor. Selecția	
hibrizilor de dud este absolut necesară pentru a asigura un material săditor cu endomicorize	27
la cel puțin 90% din hibrizii de dud utilizați pentru fitoremediere. Rezultatele cercetărilor au	
indicat o reușită de inoculare de 40% în câmpul de semănare, și de 70% în câmpul de	29
repicare. Pentru un efect fitoremediator eficient, colonizarea biomasei radiculare trebuie să	
fie de minimum 15%. Fitoacumularea formelor de plumb ce contaminează solurile are loc în	31
sistemul radicular al hibrizilor de dud ce prezintă un sistem radicular generat, pivotant,	
provenind din rădăcina embrionară, ce explorează solul până la adâncimi de 1,5...2,0 m.	33
Translocarea formelor mobile de plumb din sistemul radicular în restul organelor și țesuturilor	
de dud nu a putut fi pusă în evidență în stadiul actual al cercetărilor.	35
Înființarea, întreținerea și exploatarea plantațiilor de dud cu destinație sericicolă pe	
solurile contaminate cu plumb utilizând drept material săditor hibrizii de dud inoculați cu	37
endomicorize de tip vezicular-arbuscular, constituie în esență procedeul de fitoremediere,	
durata de decontaminare fiind de 10...20 de ani. Sistemul de cultură are în vedere utilizarea	39
unui număr mare de hibrizi de dud, pentru a intensifica procesul de decontaminare a solului,	
fapt pentru care a fost conceput sistemul de cultură în rânduri duble, cu intervale de	41
exploatare tehnologică alternativă a culturilor intercalate cu graminee perene, destinate	
înmulțirii rândurilor de dud.	43
Densitatea hibrizilor de dud plantați în sistemul rândurilor duble este de 16666 plante/ha,	
cu distanțele de plantare 2,5 x 0,5 x 0,5 m. Tehnica de plantare este cea practică pentru	45
pomi, cu excepția utilizării gunoiului de grajd, care imobilizează plumbul în sol, fiind astfel	
interzis a fi folosit, biofertilizarea hibrizilor cu endomicorize fiind suficientă pentru aprovizionarea	47
plantelor cu macro- și microminerale în cantități optime.	

1 Perioada de plantare optimă este toamna, lucrările executate fiind cele tradiționale.
În primăvară se execută lucrările de completare de goluri, de prășit mecanic și manual,
3 irigarea cu norme conform tehnologiilor curente, precum și lucrarea de suprafertilizare cu
inocul brut sau comercial de endomicorize, la nivelul sistemului radicular. În acest sezon se
5 execută și tăierile de formare a tufelor de dud, precum și controlul colonizării. După stabilirea
simbiozelor, nu mai este necesară biofertilizarea.

7 Începând cu anul 3 de la înființarea plantațiilor, se procedează la exploatarea tufelor
de dud prin recoltarea biomasei foliare și utilizarea acesteia în creșterea viermilor de mătase
9 specia *Bombyx mori*. Recoltarea frunzelor se execută prin tăierile de exploatare a tuturor
lăstarilor erbacei, cu protejarea mugurilor orbi de la baza lăstarilor, tăiere denumită "la cep".

11 Exploatarea plantațiilor de dud înființate pe terenurile contaminate cu plumb, pentru
sericicultură, s-a dovedit a fi o activitate viabilă și sustenabilă pentru valorificarea acestor
13 terenuri, viermii de mătase din specia *Bombyx mori* parcurgând ciclul biologic în totalitate,
în condițiile hrănirii cu frunze de dud contaminate cu azotat de plumb în concentrație de
15 0,004 mg/ml.

17 Producția de gogoși de mătase obținută de pe terenurile contaminate cu plumb se
valorifică în industria textilă, după filarea acestora, existând astfel avantajul evitării lanțului
alimentar cu consecințe nedorite sau imprevizibile pentru sănătatea umană, în cazul utilizării
19 altor plante fitoremediatoare.

21 Materialul săditor de dud, reprezentat de hibrizii de dud *Morus sp.* inoculați cu
endomicorize de tip vezicular-arbuscular, poate fi realizat la scară industrială în toate
pepinierile pomicole și dendrologice. Suprafețele mari contaminate cu plumb, aflate în zonele
23 localităților Copșa Mică, Mediaș, Baia Mare, pot fi plantate cu acest material săditor și
exploatare pentru practicarea sericiculturii la scară industrială, potențialul productiv fiind de
25 500 t gogoși de mătase. După o perioadă de exploatare a acestor plantații de 10...20 ani,
terenurile pot fi redat circuitului agricol după controlul nivelului de contaminare pentru alte
27 culturi agricole. Toate terenurile contaminate cu plumb pot fi cultivate cu noul tip de material
săditor de dud, pentru practicarea sericiculturii, activitate agricolă nealimentară.

Procedeu de fitoremediere a solurilor contaminate cu plumb, prin utilizarea hibrizilor de dud <i>Morus spp.</i> inoculați cu endomicorize de tip vezicular-arbuscular pentru minimum 15% din biomasa radiculară, caracterizat prin aceea că se înființează plantații cu densitate de peste 16600 plante la hectar, în sistemul de cultură cu rânduri duble, cu distanțele de plantare de 2,5 x 0,5 x 0,5 m, cu intervale de exploatare tehnologică alternativă a culturilor intercalate cu graminee perene, destinate înmulțirii rândurilor de dud, plantații exploatare pentru creșterea viermilor de mătase <i>Bombyx mori</i> începând cu anul 3 de la înființarea plantațiilor, producția de gogoși de mătase fiind destinată industriei textile, după o perioadă de exploatare a acestor plantații de 10...20 ani, terenurile putând fi redată circuitului agricol, după controlul nivelului de contaminare, pentru alte culturi agricole.	3
	5
	7
	9
	11

