



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **19.09.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. **7/2013**

(71) Solicitant:

- **BIOING S.A.**, STR. PROF. I. BOGDAN NR. 10, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOME 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 6, 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. OCTAV COCARESCU NR. 45A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **BRĂILOIU CRISTIAN**, STR. SARADEI NR. 103, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **POPA DANA**, STR. GÎRLeni NR. 2, BL. C86, AP. 35, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- **VIȘAN ADRIANA**, STR. FELEACU NR. 6, BL. 101, SC. 2, ET. 2, AP. 21, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **ICHIM LIVIU-IONEL**, STR. HUȘI NR. 7, BL. P A 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

(54) **FITOREMEDIEREA SOLURILOR CONTAMINATE CU PLUMB, UTILIZÂND HIBRIZI DE DUD MORUS, SPP., INOCULAȚI CU ENDOMICORIZE VEZICULAR ARBUSCULARE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de fitoremediere a solurilor contaminate cu plumb, prin utilizarea unor hibrizilor de dud *Morus spp.* inoculați cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular, pentru minimum 15% din biomasa radiculară cu care se înființează plantații cu densitate mare, în sistem de cultură cu

rânduri duble, exploatate pentru creșterea viermilor de mătase *Bombyx mori* și producția de gogoși de mătase destinată industriei textile.

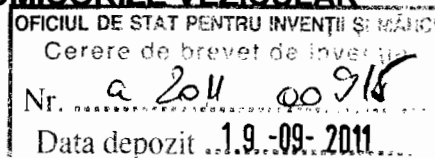
Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art. 32 din Legea nr. 64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin. (1) - (3).



f

**FITOREMEDIEREA SOLURILOR CONTAMINATE CU PLUMB, UTILIZAND
HIBRIZI DE DUD MORUS SPP., INOCULATI CU ENDOMICORIZE VEZICULAR
ARBUSCULARE**



Autori: Ichim Maria, Diaconescu Cristiana, Tanase Doina, Urdes Laura, Brailoiu Cristian, Popa Dana, Visan Adriana, Ichim Liviu-Ionel, Enache Ramona

Inventia se refera la un procedeu de fitoremediere a solurilor contaminate cu plumb prin utilizarea hibrizilor de dud *Morus spp.*, biofertilizati cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular, valorificand astfel aceste soluri pentru sericicultura.

Este cunoscut ca masuratorile anterioare privind poluarea solurilor in Romania (realizate inainte de 1989) au aratat ca aproximativ 900.000 ha au fost afectate in mod diferit de diverse tipuri de poluanti.

In cadrul Sistemului National de Monitorizare a Poluarii au fost identificate 5 tipuri de poluare, dintre care de interes pentru tematica brevetului este poluarea produsa de reziduuri si deseuri anorganice formate din minerale, materii anorganice, metale, saruri, acizi si baze.

In zonele Baia Mare, Copsa Mica, Zlatna, Turnu Magurele si Valea Calugareasca sunt afectate peste 185.000 ha prin poluare cu metale grele si emisii de SO₂, solurile suferind si de acidifiere, iar suprafata totala poluata fiind de peste 319.000 ha, din care aproximativ 42.600 ha sunt grav afectate.

Metalele grele sunt elemente chimice comune tuturor solurilor, iar abundenta lor se situeaza intre domeniul procentelor (fier) si cel al miligramelor per kilogram sol. Nivelul normal foarte redus din sol si planta precum si rolul fiziologic al unora din aceste elemente chimice au condus la gruparea lor sub titlul generic de "microelemente".

In acceptiunea chimistilor si a cercetatorilor din domeniul mediului inconjurator, metalele grele reprezinta acele elemente chimice cu caracter metalic, cu greutatea specifica mai mare decat 5. In aceasta grupa sunt cuprinse urmatoarele elemente chimice: fierul, manganul, cadmiul, cobaltul, cromul, cuprul, nichelul, mercurul, plumbul, zincul, vanadiul. Unele dintre aceste elemente chimice precum cadmiul, mercurul si plumbul au caracter semnificativ de toxicitate, iar altele in cantitati reduse au insusiri nutritive contribuind la o serie de procese biochimice pe parcursul cresterii si dezvoltarii plantelor. Din aceasta categorie fac parte: fierul, manganul, cuprul, zincul. Numai atunci cand absorbtia lor se realizeaza la intensitati ridicate aceste elemente chimice au efect negativ asupra cresterii si

dezvoltarii plantelor.

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

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

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

La Copsa Mica și Baia Mare poluantul specific de interes a fost plumbul din pulberile în suspensie, concentrațiile fiind comparate cu cele determinate în zona Medias și Zlatna.

Valorile frecvențelor de depășire ale CMA (%), adică concentrația maximă admisibilă, pentru plumb este de 57,33% reprezentând 0,017 mg/m³ sol la Baia Mare și de 70,29% reprezentând 0,020 mg/m³ sol la Copsa Mica.

Fitoremedierea este utilizată pentru depoluarea solurilor contaminate cu metale grele și se bazează în general pe capacitatea plantelor hiperacumulatoare de metale grele în 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 hiperacumulatoare 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.

Plantele de dud, aparținând genului *Morus* spp. sunt considerate plante cu importanță economică pentru sericicultură, frunza de dud constituind unică sursă de hrană a viermilor de mătase din specia *Bombyx mori*. Din punct de vedere botanic plantele de dud aparțin diferitelor specii din genul *Morus*, fiind plante unisexuate dioice, înmultite pe cale vegetativă sau sexuată.

În literatura de specialitate este cunoscut că, rădăcinile plantelor *Morus* spp. 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.

Plantele *Morus spp.* sunt ideale in fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb deoarece au crestere rapida si produc o cantitate mare de biomasa in timp ce acumuleaza concentratii crescute de plumb.

Fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb prin utilizarea hibridilor de duzi (inmultire sexuata) apartinand formelor parentale din genul *Morus spp.*, constituie o noutate pentru Romania, iar biofertilizarea acestora cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular constituie noutate la nivel international.

Pentru imbunatatirea parametrilor bioproductivi ai vitroplantulelor de dud s-a luat in considerare biofertilizarea acestora cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular, rezultatele fiind extrem de incurajatoare pentru cultura dudului in Romania pe solurile contaminate cu plumb.

Efectul major al simbiozelor micorizale asupra plantelor gazda consta din cresterea aportului de elemente minerale, in special al celor care in stare ionica prezinta o mobilitate redusa sau care sunt prezente in concentratii suboptimale (fosfor, amoniu, zinc, cupru, inclusiv contaminanti precum plumbul).

Potentialul biosintetic al radacinilor de la dud este putin studiat pe plan mondial, fapt ce evidentiaza importanta cercetarilor initiate pe plan national privind stabilirea de clone in conditii "in vitro" si experimentarea biofertilizarii cu endomicorize vezicular - arbusculare a vitroplantulelor si a plantulelor de dud.

Combinarea efectului fungilor de micorize asupra ecosistemului planta - sol la hibridii de dud creeaza premisa utilizarii cu succes a acestora in fitoremediere, care are ca scop utilizarea acestor plante pentru detoxifierea mediului poluat, ca abordare biotehnologica de mare perspectiva.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in utilizarea hibridilor de dud biofertilizati cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular in fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb, prin mobilizarea in rizosfera plantelor a formelor imobile de plumb si bioacumularea acestora in biomasa radiculara.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

Materialul saditor de dud format din hibridi de dud fertilizati cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular prezinta o rezistenta sporita la agentii patogeni specifici, iar sistemul lor radicular permite o mobilizare si absorbtie mai buna a macro si micro elementelor din sol inclusiv a unor metale grele imobilizate in particulele de sol, realizand astfel si decontaminarea solurilor la nivele optime de continut.

Cercetarile recente au abordat aspecte privind fitoremedierea solurilor contaminate cu plumb prin infiintarea unor plantatii de dud cu destinatie sericicola, ce permit valorificarea economica a acestora prin obtinerea unor gogosi de matase destinate industriei textile.

Cercetarile efectuate de catre autorii inventiei au condus la utilizarea unui material saditor de dud cu efect fitoremediator al solurilor contaminate cu plumb.

Exemple de realizare a inventiei:

Se prezinta, in continuare, doua exemple de realizare a inventiei:

Exemplul 1. Obtinerea inoculilor endomicorizati de tip vezicular - arbuscular se realizeaza procedand astfel pentru inoculul brut:

In parcelele cultivate cu porumb sau ceapa, se recolteaza biomasa radiculara a plantelor, aceasta urmand a fi conditionata prin maruntirea materialului vegetal pe o adancime a solului de 20 - 30 cm, inclusiv a particulelor de sol aderente, folosind o moara cu ciocanele si omogenizare cu ajutorul unui melc transportor. Perioada optima pentru recoltarea biomasei radiculare este in fenofaza de postrecoltare a productiei principale. Inoculul brut astfel obtinut se pastreaza in conditii de depozitare cu umiditate relativa a aerului, de maximum 60%, fara pericol de mucegai sau de rozatoare. Forma de prezentare poate fi vrac sau in saci de 50 kg.

Utilizarea biomasei radiculare de porumb sau ceapa asigura un inocul brut de endomicorize de tip vezicular - arbuscular sigur, dar pentru control, inainte de utilizare, se procedeaza la caracterizarea acestuia prin metoda de colorare Trypan blue.

Exemplul 2. Realizarea hibrizilor de dud inoculati cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular si repicarea acestora cuprinde lucrarile de obtinere a substratului de repicare format din pamant de telina, mranita si nisip, in proportii egale, ce se sterilizeaza prin autoclavizare la temperatura de 110°C, timp de 60 de minute, dupa racire fiind amestecat cu inoculul brut in doza de 100 g/ 1000 g amestec de substrat sau in doza de 25 mg inocul comercial/ 1000 g de substrat. Biofertilizantii comerciali contin flora activa si linii selectate ale fungilor de *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* si *Sclerocystis* sp. Pamantul de telina utilizat in obtinerea stratului de repicare poate proveni din arealele contaminate, daca concentratia formelor de plumb din sol este mai mica de 0,04% in solutia solului. Daca concentratia este mai mare pamantul de telina trebuie procurat din zone necontaminate.

Substratul de repicare inoculat astfel obtinut se modeleaza sub forma de brazde cu latimea de 60 cm si inaltimea de 40 cm. In brazdele astfel modelate sunt semanate semintele de dud, pregerminate timp de 48 ore in apa de robinet. Semanatul se realizeaza in doua randuri paralele de-a lungul brazdei la o distanta de 20 cm, la o adancime de 1-1,5 cm utilizand 5 g de samanta pe 1 mp suprafata. Pentru uniformizarea semanatului se foloseste amestecarea semintei cu nisip in proportie de 1:10, semintele fiind acoperite cu nisip si mranita. Lucrarile de intretinere in perioada de vegetatie constau din plivitul buruienilor de cate ori este necesar si irigarea in picatura a brazdelor cu plantulele de dud. La sfarsitul perioadei de vegetatie se executa recoltarea hibrizilor de dud si stratificarea acestora. In

aceasta etapa se realizeaza urmatoarele activitati:

- Controlul colonizarii si selectia hibrizilor de dud inoculati se realizeaza prin aplicarea metodei de colorare cu Trypan blue.

Controlul si selectia hibrizilor de dud inoculati prin aceasta metoda se aplica prin control randomizat al puietilor de dud recoltati din campul de semanare la un numar de 10 plante/ 1000 hibrizi de dud.

Puietii de dud necolonizati se vor suprainocula prin administrarea inoculului brut sau comercial, in dozele mentionate, individual odata cu plantatul, toate plantele urmand a fi udate zilnic timp de 7 zile dupa repicare in zona radiculara, iar udarile urmatoare devenind saptamanale. Suprainocularea se poate repeta de cel mult 3 ori pana la sfarsitul perioadei de vegetatie.

Hibrizii de dud prezinta caracteristici genetice heterozigotice si fenotipice diverse. Biofertilizarea cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular prezinta rezultate privind colonizarea ce depinde de bicompatibilitatea cu fungii componentii ai inoculilor. Selectia hibrizilor de dud este absolut necesara pentru a asigura un material saditor cu endomicorize la cel putin 90% din hibrizii de dud utilizati pentru fitoremediere. Rezultatele cercetarilor au indicat o reusita de inoculare de 40% in campul de semanare si de 70% in campul de repicare. Pentru un efect fitoremediator eficient colonizarea biomasei radiculare trebuie sa fie de minim 15%. Fitoacumularea formelor de plumb ce contamineaza solurile are loc in sistemul radicular al hibrizilor de dud ce prezinta un sistem radicular generat, pivotant provenind din radacina embrionara, ce exploreaza solul pana la adancimi de 1,5-2,0 m. Translocarea formelor mobile de plumb din sistemul radicular in restul organelor si tesuturilor de dud nu a putut fi pusa in evidenta in stadiul actual al cercetarilor.

- Infiintarea, intretinerea si exploatarea plantatiilor de dud cu destinatie sericicola pe solurile contaminate cu plumb utilizand drept material saditor hibrizii de dud inoculati cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular, constituie in esenta procedeul de fitoremediere, durata de decontaminare fiind de 10 - 20 de ani. Sistemul de cultura are in vedere utilizarea unui numar mare de hibrizi de dud pentru a intensifica procesul de decontaminare a solului, fapt pentru care a fost conceput sistemul de cultura in randuri duble cu intervale de exploatare tehnologica alternativa a culturilor intercalate cu graminee perene, destinate inmultirii randurilor de dud.

Densitatea hibrizilor de dud plantati in sistemul randurilor duble este de 16.666 plante/ ha, cu distantele de plantare 2,5 x0,5x0,5 m. Tehnica de plantare este cea practicata pentru pomi, cu exceptia utilizarii gunoiului de grajd, care imobilizeaza plumbul in sol, fiind astfel interzis a fi folosit, biofertilizarea hibrizilor cu endomicorize fiind suficienta pentru aprovizionarea plantelor cu macro si micro minerale in cantitati optime.

Perioada de plantare optima este toamna, lucrarile executate fiind cele traditionale. In

primavara se executa lucrarile de completare de goluri, de prasit mecanic si manual, irigarea cu norme conform tehnologiilor curente, precum si lucrarea de suprafertilizare cu inocul brut sau comercial de endomicorize, la nivelul sistemului radicular. In acest sezon se executa si taierile de formare a tufelor de dud, precum si controlul colonizarii. Dupa stabilirea simbiozelor, nu mai este necesara biofertilizarea.

Incepand cu anul 3 de la infiintarea plantatiilor se procedeaza la exploatarea tufelor de dud prin recoltarea biomasei foliare si utilizarea acesteia in crestera viermilor de matase specia Bombyx mori. Recoltarea frunzelor se executa prin taierile de exploatare a tuturor lastarilor ierbacei, cu protejarea mugurilor orbi de la baza lastarilor, taiere denumita *la cep*.

Exploatarea plantatiilor de dud infiintate pe terenurile contaminate cu plumb pentru sericicultura s-a dovedit a fi o activitate viabila si sustenabila, pentru valorificarea acestor terenuri, viermii de matase din specia Bombyx mori parcurgand ciclul biologic in totalitate, in conditiile hranirii cu frunze de dud contaminate cu azotat de plumb in concentratie de 0.004 mg/ml.

Productia de gogosi de matase obtinuta de pe terenurile contaminate cu plumb, se valorifica in industria textila, dupa filarea acestora, existand astfel avantajul evitarii lantului alimentar cu consecinte nedorite sau imprezibile pentru sanatatea umana, in cazul utilizarii altor plante fitoremediatoare.

Materialul saditor de dud reprezentat de hibridii de dud *Morus spp*, inoculati cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular poate fi realizat la scara industriala in toate pepinierele pomicole si dendrologice. Suprafetele mari contaminate cu plumb aflate in zonele localitatilor Copsa Mica, Medias, Baia Mare pot fi plantate cu acest material saditor si exploatare pentru practicarea sericulturii la scara industriala, potentialul productiv fiind de 500 tone gogosi de matase. Dupa o perioada de exploatare a acestor plantatii de 10-20 ani, terenurile pot fi redade circuitului agricol dupa controlul nivelului de contaminare pentru alte culturi agricole. Toate terenurile contaminate cu plumb pot fi cultivate cu noul tip de material saditor de dud pentru practicarea sericulturii, activitate agricola nealimentara.

**FITOREMEDIEREA SOLURILOR CONTAMINATE CU PLUMB, UTILIZAND
HIBRIZI DE DUD MORUS SPP., INOCULATI CU ENDOMICORIZE VEZICULAR
ARBUSCULARE**

Autori: Ichim Maria, Diaconescu Cristiana, Tanase Doina, Urdes Laura, Brailoiu Cristian,
Popa Dana, Visan Adriana, Ichim Liviu-Ionel, Enache Ramona

REVENDICARI

1. Procedeu de obtinere ce consta in utilizarea hibrizilor de dud *Morus* spp., inoculati cu endomicorize de tip vezicular - arbuscular pentru minim 15% din biomasa radiculara destinata fitoremedierii solurilor contaminate cu plumb, **caracterizat prin aceea ca se infiinteaza plantatii cu densitate de peste 16.600 plante la hectar, in sistemul de cultura cu randuri duble, exploatate pentru cresterea viermilor de matase Bombyx mori, productia de gogosi de matase fiind destinata industriei textile.**