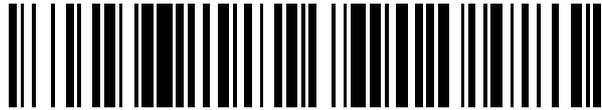


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 701**

51 Int. Cl.:

B09C 1/00 (2006.01)

B09C 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010 E 10721434 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2429729**

54 Título: **Uso de Cistus libanotis para limpiar suelos que contienen metales pesados**

30 Prioridad:

12.05.2009 EP 09305421

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DÉVELOPPEMENT (IRD) (25.0%)
Immeuble le Sextant 44 Bd Dunkerque CS90009
13002 Marseille 2, FR;
UNIVERSITÉ MOHAMMED V - AGDAL - MAROC
(FACULTÉ DES SCIENCES DE RABAT) (25.0%);
UNIVERSITÉ ABDELMALEK ESSAÂDI (FACULTÉ
DES SCIENCES DE TÉTOUAN) (25.0%) y
CENTRE NATIONAL DE L'ENERGIE, DES
SCIENCES ET DES TECHNIQUES NUCLÉAIRES
(CNESTEN) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LAPLAZE, LAURENT;
DOUMAS, PATRICK;
SMOUNI, ABDELAZIZ;
BRHADA, FATIHA y
ATER, MOHAMED**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 444 701 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de *Cistus libanotis* para limpiar suelos que contienen metales pesados

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente europea nº EP 09305421.1 presentada el 12 de mayo de 2009. La solicitud de patente europea se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

5 **Antecedentes de la invención**

Aunque no es un fenómeno nuevo, la magnitud de la contaminación ha aumentado con el tiempo y se ha vuelto un verdadero problema debido a sus efectos sobre el ambiente y a los riesgos potenciales para la salud humana.

La contaminación con iones metálicos tóxicos es quizá uno de los problemas ambientales más difíciles, puesto que al contrario que los compuestos orgánicos, que pueden degradarse en el suelo, los metales son esencialmente inmutables. Las fuentes de metales en el entorno se originan tanto por procesos geoquímicos naturales como por actividades humanas (tales como la industria de fundición de metales, residuos de minería metalífera, combustión de combustible fósil, uso agrícola de plaguicidas, fertilizantes y fangos cloacales). Los metales pesados, tales como cadmio, cromo, cobre, plomo, arsénico, mercurio, níquel y cinc, han alcanzado niveles tóxicos en el aire, tierra y agua de muchas partes del mundo. Además, el viento y/o la lluvia pueden dispersar a veces contaminantes metálicos a gran distancia de sus puntos de uso, producción o eliminación, lo que aumenta significativamente la posibilidad de poner en peligro fauna silvestre y ecosistemas inicialmente no afectados. La contaminación del suelo por metales pesados es por tanto una gran preocupación en todo el mundo. En particular, el plomo es uno de los contaminantes metálicos pesados más dañinos. El plomo se usa ampliamente en el campo industrial y su extracción y tratamiento proporcionan residuos que contienen metal pesado que generalmente no se retiran. Estos desechos han aumentado la concentración de metales tóxicos en el ambiente y son responsables de problemas de salud y ambientales.

Las estrategias de limpieza de suelos que se han desarrollado y se usan actualmente implican prácticas de ingeniería civil tales como recubrimiento, excavación, lavado de suelo, tratamiento térmico y tratamiento químico. Estos métodos son generalmente muy caros e invasivos, destruyendo la estructura, fertilidad y productividad del suelo. El desarrollo de tecnologías correctoras alternativas económicamente eficaces es por ello de interés.

En los últimos años, se han desarrollado métodos de fitocorrección. Estos métodos usan el hecho de que las plantas requieren al menos 17 elementos para completar sus ciclos vitales, incluyendo los metales pesados cobre (Cu), cinc (Zn) y níquel (Ni); y acumulan metales no esenciales tales como plomo (Pb) cuando estos están presentes en el ambiente. Por tanto, la fitocorrección implica retirar metales pesados del ambiente cultivando una planta que absorba y acumule metales pesados presentes en el suelo y recolectando y retirando entonces la planta.

Existen al menos 400 plantas hiperacumuladoras de metal conocidas en el mundo; sin embargo, solo un número limitado de estas son hiperacumuladoras de plomo. Por ejemplo, las siguientes plantas son conocidas por su uso en la fitoextracción de plomo: *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Thlaspi caerulescens* y *Fagopyrum esculentum*. La patente de EE.UU. nº 5.364.451 da a conocer el uso de plantas de la familia *Brassicaceae* en un proceso para retirar iones metálicos tales como plomo y cromo de suelos. Tamura *et al.* (*J. Plant Res.*; 2005, 118: 355-359) han descrito el uso de *Fagopyrum esculentum* para la fitocorrección de plomo según el preámbulo de la reivindicación 4.

Sin embargo, algunas plantas hiperacumuladoras de plomo, tales como *Thlaspi rotundifolium*, tienen una biomasa pequeña y un índice de crecimiento lento, lo que las hace inadecuadas para fitocorrección. Además, las plantas tales como *Brassicaceae* son plantas anuales y por tanto exhiben la desventaja de requerir ciclos repetidos de plantación y recolección de plantas enteras para descontaminar totalmente la misma zona de tierra.

Por tanto, existe la necesidad en la técnica de un método alternativo mejorado para la fitocorrección específica de plomo.

Sumario de la invención

Los inventores han encontrado que *Cistus libanotis*, una de las especies del género (*Cistus*) de plantas con flor de la familia de la jara *Cistaceae*, tiene una alta capacidad de acumular específicamente plomo. Además, *Cistus libanotis* presenta la gran ventaja de ser perenne.

Por consiguiente, es un objeto de la invención el uso de *Cistus libanotis* para fitocorrección de plomo.

En una realización, se usa *Cistus libanotis* para fitoextracción de plomo.

En otra realización, se usa *Cistus libanotis* para fitoestabilización de plomo.

Es otra realización un método de fitocorrección que comprende absorber un metal pesado contenido en un medio contaminado (por ejemplo, un suelo contaminado) usando una planta hiperacumuladora de metal para limpiar el medio, en el que el metal pesado es plomo y la planta hiperacumuladora es *Cistus libanotis*.

En una realización de la invención, el medio contaminado es suelo contaminado y el contenido de plomo en el suelo que contiene metal pesado es mayor de 50 mg/kg.

En una realización de la invención, la planta *Cistus libanotis* que tiene plomo acumulado se recolecta e incinera.

5 En otra realización de la invención, las cenizas obtenidas mediante la incineración de dicha planta se tratan por vitrificación con un arco de plasma.

La presente invención proporciona también un método de fitocorrección que comprende una etapa de: cultivar una planta *Cistus libanotis* en un medio contaminado que contiene una cantidad excesiva de plomo en condiciones en que la planta acumule plomo, con lo que se reduce el contenido de plomo del medio. En ciertas realizaciones, el medio contaminado es un suelo contaminado y el contenido de plomo del suelo contaminado es mayor de 50 mg/kg.

10 En ciertas realizaciones, la planta *Cistus libanotis* se cultiva a partir de una semilla que, antes de la germinación, se ha incubado en agua a 100 °C durante 1 hora con agitación ocasional. Este tratamiento a alta temperatura potencia significativamente la germinación.

15 En ciertas realizaciones, el método de fitocorrección comprende adicionalmente una etapa de adición de un agente quelante biodegradable al medio contaminado en que se cultiva la planta *Cistus libanotis*. El agente quelante biodegradable puede seleccionarse del grupo consistente en diacetato de metilglicina (MGDA), ácido etilensuccínico (EDTS), diacetato del ácido L-glutámico (GLDA), diacetato del ácido L-aspartico (ASDA), cualquier sal de los mismos y cualquier mezcla de los mismos.

20 En ciertas realizaciones, el método de fitocorrección comprende adicionalmente una etapa de recolección de la planta *Cistus libanotis* que ha acumulado plomo. Preferiblemente, en el momento de la recolección, la planta *Cistus libanotis* ha acumulado una concentración de plomo de al menos 1000 mg/kg.

En ciertas realizaciones, el método de fitocorrección comprende adicionalmente las etapas de: incinerar la planta *Cistus libanotis* recolectada obteniendo así plomo en cenizas y tratar las cenizas obtenidas. Por ejemplo, las cenizas obtenidas pueden tratarse por vitrificación con un arco de plasma, volviendo inerte el plomo.

25 Estos y otros objetos, ventajas y rasgos de la presente invención resultarán evidentes para los especialistas en la técnica que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

Breve descripción del dibujo

30 La **Figura 1** es una gráfica que muestra el efecto de la temperatura sobre la germinación de *Cistus libanotis*. Antes de la germinación, se incubaron las semillas en agua durante 1 hora a diferentes temperaturas (25 °C, 50 °C o 100 °C), como se describe en el ejemplo 3. Los datos son medias \pm DE ($n > 100$ para cada tratamiento). Se repitió este experimento varias veces y dio resultados similares.

Descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas

Como se menciona anteriormente, la presente invención se refiere a sistemas y estrategias mejorados para la fitocorrección de suelo. Más específicamente, la invención proporciona el uso de *Cistus libanotis* para fitocorrección de plomo.

35 *Cistus Libanotis*

40 *Cistus* (*Cistaceae*) es uno de los géneros más característicos de la flora mediterránea. La adaptación del género a ambientes mediterráneos es evidente a partir de las características ecológicas tales como la germinación de semilla dependiente del fuego (Roy y Sonié, *J. Appl. Ecol.*, 1992, 29: 647-655; Trabaud y Renard, *Israel J. Plant Sci.*, 1999, 47: 1-9), la polinización dependiente de insectos (Talavera *et al.*, *Plant Syst. Evol.*, 1993, 186: 123-134), la reproducción dependiente de flores (Herrera, *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 1987, 74: 69-78) y la fenología dependiente de la primavera (Herrera, *Vegetatio*, 1986, 68, 91-98). Por tanto, *Cistus libanotis* está bien adaptada al clima seco.

45 *Cistus libanotis* tiene varias ventajas: es una planta perenne, por lo tanto no tiene que plantarse cada año. Además, *Cistus libanotis* crece rápidamente incluso cuando se cultiva en suelo no productivo. Además, un gran interés en el uso de *Cistus libanotis* en procesos de fitocorrección es que tiene poca probabilidad de entrar en la cadena alimentaria, puesto que la planta habitualmente no se ingiere por animales.

Fitocorrección

50 Como se usa en la presente memoria, el término "fitocorrección" hace referencia al tratamiento de problemas ambientales mediante el uso de plantas. La fitocorrección consiste en descontaminar suelos, aguas o aire contaminados con plantas capaces de contener, degradar o eliminar metales, plaguicidas, disolventes, explosivos, petróleo bruto y sus derivados y diversos otros contaminantes de los medios que los contienen.

Son conocidos en la técnica diversos procesos de fitocorrección: fitoextracción, fitoestabilización, fitotransformación, fitoestabilización, fitovolatilización y rizofiltración.

5 La fitoextracción hace referencia a un proceso en el que la planta absorbe contaminantes a través del sistema de raíces y almacena estos contaminantes en la biomasa radicular y/o los transporta a los tallos y/u hojas. La fitoestabilización hace referencia a un proceso en el que la planta se usa para secuestrar contaminantes de modo que se vuelvan menos disponibles los contaminantes y se reduzca la exposición a ganado, fauna silvestre y seres humanos. La fitotransformación hace referencia a un proceso en el que el contaminante se modifica por el metabolismo de la planta, volviendo al contaminante menos o nada tóxico. La fitoestimulación hace referencia a un proceso en el que se potencia la actividad microbiana del suelo para la degradación de contaminantes. La fitovolatilización hace referencia a un proceso en el que las sustancias tóxicas se retiran del suelo o agua y se liberan al aire. La rizofiltración hace referencia a un proceso en el que se filtra agua a través de una masa de raíces para retirar sustancias tóxicas.

15 El éxito de la fitocorrección, en general, depende de varios factores. En primer lugar, la planta debe producir suficiente biomasa mientras acumula altas concentraciones de metales. En segundo lugar, las plantas acumuladoras de metal tienen que ser sensibles a prácticas agrícolas que permitan la plantación y recolección repetidas del tejido rico en metal.

20 Por lo tanto, parecía que *Cistus libanotis* exhibe la capacidad potencial de usarse en fitocorrección, en particular en procedimientos de fitoestabilización, y es capaz de reducir los riesgos de la movilidad metálica y de disminuir la degradación ambiental posterior. El uso de *Cistus libanotis* en la limpieza de suelo que contiene metales pesados proporciona por ello la consiguiente ventaja económica y ambiental.

Uso de *Cistus libanotis* en fitocorrección

Es un objeto de la invención el uso de *Cistus libanotis* para la fitocorrección de plomo.

En una realización de la invención, se usa *Cistus libanotis* para la fitoextracción de plomo.

25 En otra realización de la invención, se usa *Cistus libanotis* para la fitoestabilización de plomo. Esta realización es de gran interés ya que inhibe la volatilización de las partículas de plomo y reduce la diseminación del plomo por viento y agua, evitando así la exposición de animales y seres humanos al plomo.

En otra realización de la invención, se usa *Cistus libanotis* para la rizofiltración de plomo.

Métodos de fitocorrección usando *Cistus libanotis*

La invención está también dirigida a un método para retirar plomo de suelos contaminados usando *Cistus libanotis*.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "suelos contaminados" hace referencia a un suelo en el que el plomo está presente superando un valor estándar ambiental prescrito por los reglamentos o leyes y superando el valor que se considera que tiene un efecto negativo sobre la salud humana. Por tanto, en ciertas realizaciones, el término suelos contaminados con plomo hace referencia a suelos que comprenden más de 50 mg/kg de plomo. La concentración de plomo en una muestra de suelo puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Generalmente, la concentración de plomo se determina mediante técnicas fisicoquímicas tales como espectrometría de masas.

40 Los suelos contaminados a los que puede aplicarse la invención incluyen cualquier suelo en que una planta pueda cultivarse tales como tierras industriales, tierras agrícolas, tierras residenciales y suelos naturales tales como montañas, bosques y similares, pero también cualquier medio en que una planta pueda cultivarse mediante un tratamiento adecuado tal como limos, fangos y similares.

En particular, es otro objeto de la invención un método de fitocorrección que comprende absorber un metal pesado contenido en un suelo contaminado usando una planta hiperacumuladora de metal para limpiar el suelo, en el que el metal pesado es plomo y la planta hiperacumuladora de metal es *Cistus libanotis*.

45 En ciertas realizaciones, el método de fitocorrección de la invención comprende una etapa de: cultivar una planta *Cistus libanotis* en un medio contaminado que contiene una cantidad excesiva de plomo en condiciones en que la planta acumule plomo, con lo que se reduce la cantidad de plomo del medio. El medio contaminado puede ser suelo contaminado (como se describe anteriormente), agua contaminada o cualquier medio en que pueda cultivarse una planta. En ciertas realizaciones preferidas, el medio contaminado es un suelo contaminado.

50 En la práctica de la presente invención, la planta *Cistus libanotis* puede sembrarse directamente en el suelo contaminado o, como alternativa, puede sembrarse y germinarse en otro lugar y plantarse entonces, como plántula, en el suelo contaminado.

En ciertas realizaciones de la invención, el método de fitocorrección comprende adicionalmente una etapa de: recolectar la planta *Cistus libanotis* que ha acumulado plomo. Por ejemplo, la planta *Cistus libanotis* puede recolectarse cada 3 a 5 años.

5 La concentración de fondo de plomo en *Cistus libanotis* es de aproximadamente 10 mg/kg. Generalmente, en el momento de la recolección, la concentración de plomo acumulado en la planta *Cistus libanotis* es mayor que la concentración de fondo. Preferiblemente, en el momento de la recolección, la concentración de plomo acumulado en la planta *Cistus libanotis* es al menos la concentración de hiperacumulación de plomo. Se dice que una planta es una hiperacumuladora si puede concentrar un contaminante a un porcentaje mínimo que varía según el contaminante implicado. En el caso del plomo, la concentración de hiperacumulación es de 1000 mg/kg de peso seco. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, en el momento de la recolección, la concentración de plomo
10 acumulado en la planta *Cistus libanotis* es de al menos 1000 mg/kg.

En ciertas realizaciones de la invención, el método de fitocorrección comprende adicionalmente una etapa de: tratamiento de la planta *Cistus libanotis* recolectada. La etapa de tratamiento de *Cistus libanotis* puede comprender: incinerar la planta *Cistus libanotis* recolectada para obtener cenizas que contienen plomo, y efectuar un postratamiento de las cenizas. El postratamiento de esas cenizas puede realizarse mediante vitrificación con arco de plasma, como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.532.768, que da a conocer un proceso diseñado para volver inerte por vitrificación cualquier tipo de desecho o residuo sólido que contenga, por ejemplo, metales pesados tales como plomo, que debe destruirse, transformarse o atraparse para reciclado o almacenamiento. Por tanto, en ciertas realizaciones preferidas, se efectúa el postratamiento de las cenizas que contienen plomo para destruir, transformar o atrapar el plomo contenido en las cenizas, permitiendo así el almacenamiento o reciclado del plomo.
15
20

En ciertas realizaciones de la invención, el método de fitocorrección comprende adicionalmente una etapa de: añadir un agente quelante biodegradable al medio contaminado (por ejemplo, suelo contaminado) durante la etapa de crecimiento de la planta *Cistus libanotis*. El agente quelante biodegradable se añade generalmente para mejorar la absorción del plomo por *Cistus libanotis*.

25 Los ejemplos de dicho agente quelante biodegradable incluyen, pero sin limitación, diacetato de metilglicina (MGDA), ácido etilensuccínico (EDTS), diacetato del ácido L-glutámico (GLDA), diacetato del ácido L-aspártico (ASDA), cualquier sal adecuada de los mismos y cualquier mezcla de los mismos. En contraposición, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) no es un agente quelante adecuado para uso en la práctica de la presente invención. Es más, puesto que el EDTA, que es conocido por tener una alta capacidad de disolución de plomo, no es degradable, permanecería en el suelo, y puede causar contaminación ambiental secundaria.
30

La cantidad de agente quelante biodegradable para añadir al suelo contaminado puede ser diferente dependiendo de la concentración de metales pesados en el suelo, la naturaleza del suelo, los tipos de agente quelante biodegradable usados, la capacidad del agente quelante biodegradable de disolver metales pesados en un suelo y el tipo de método de adición usado, así como del momento de adición del agente quelante biodegradable. Un especialista en la técnica sabrá cómo determinar la cantidad adecuada para añadir basándose en los factores anteriores. En general, la cantidad de agente quelante biodegradable variará de 0,01 a 100 mmol/kg.
35

El agente quelante biodegradable puede añadirse al suelo contaminado (o más generalmente al medio contaminado) mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el agente quelante biodegradable puede añadirse mediante un método de pulverización o rociado de gránulos, polvos o una disolución acuosa del agente quelante directamente al suelo. Sin embargo, en ciertas realizaciones, por ejemplo cuando la concentración de la disolución acuosa de agente quelante biodegradable es alta, la disolución acuosa puede añadirse al suelo contaminado mediante un método que evite el contacto directo del agente quelante con la planta *Cistus libanotis*.
40

El agente quelante biodegradable puede añadirse al contaminado antes de introducir la planta *Cistus libanotis* en el suelo contaminado (concretamente, antes de sembrar o plantar) y/o puede añadirse en un momento predeterminado después de la introducción de la planta *Cistus libanotis*. En ciertas realizaciones, la cantidad de agente quelante biodegradable añadida puede elegirse de modo que el agente quelante esté presente en un suelo solo durante un periodo predeterminado de tiempo antes de recolectar la planta *Cistus libanotis*.
45

Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos de realización y práctica de la presente invención. Sin embargo, debería entenderse que los ejemplos son solo con fines ilustrativos y que no se pretende que limiten el alcance de la invención. Además, a menos que la descripción de un ejemplo se presente en tiempo pasado, no se pretende que el texto, como el resto de la memoria descriptiva, sugiera que los experimentos se efectuaron realmente o los datos se obtuvieron realmente.

55 Ejemplo 1: Medidas en el sitio

Para identificar las plantas tolerantes al plomo, los presentes inventores han examinado especies de planta que crecen en dos sitios de minería (Touissit y Boubker) y un sitio industrial (trabajos de fundición, Oued El Heimer)

localizados en Marruecos y que se conocía que estaban contaminados con plomo y un sitio de control en una zona cercana. La zona elegida para este estudio está localizada en Marruecos oriental, cerca de Oujda.

Se recogieron veinticinco (25) muestras de suelo y 67 muestras de planta en esos sitios. Se recogieron también quince (15) muestras de agua en diferentes sitios. Se lavaron las muestras de planta con agua destilada para retirar cualquier contaminación de superficie. Las muestras de suelo corresponden a los 15 cm superiores del suelo. Se secaron en estufa las muestras de planta y suelo a 70 °C durante 48 horas antes del análisis. Se extrajeron los metales pesados totales mediante digestión con ácido nítrico-ácido perclórico. Se midieron los contenidos de metal mediante espectroscopia de emisión atómica-plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).

El análisis de las muestras de suelo (cuyos resultados se presentan en la Tabla 1) mostró que los suelos ensayados contenían una alta concentración de plomo, particularmente la estación 2 (Oued El Heimer). Las plantas incluyendo *Cistus libanotis* que crecen en estas condiciones eran tolerantes al plomo. Además, los presentes inventores encontraron que las plantas *Cistus libanotis* acumulaban plomo en sus tejidos aéreos (Tabla II) a concentraciones por encima del umbral que define las plantas hiperacumuladoras de plomo (> 1000 mg/kg). Se observó la concentración máxima de Pb en plantas que crecen en suelos que contienen los niveles máximos de Pb disponible, mostrando por tanto que la concentración de plomo está afectada por el suelo. Sin embargo, se encontró que incluso las plantas que crecen en un suelo que contiene poco Pb (estación 2) son capaces de acumular plomo a alta concentración.

Tabla I. Concentración de metales pesados en las muestras de suelo (mg/kg). El umbral de contaminación para Pb es de 50 mg/kg

Muestra	Al	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
Control	26388,6	≤ 0,36	≤ 0,03	6,49	20,61	24,00	9,18
Oued El Heimer							
Estación 2	8505,27	6,62	8,93	9,77	0,48	724,97	95,92
Estación 4	1487,31	10,33	0,52	0,36	≤ 0,1	26,38	527,52

Tabla II. Concentración de metales pesados en plantas *Cistus libanotis* de Oued El Heimer (mg/kg)

Muestra	Al	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
Planta 1 (estación 2)	540,88	11,39	9,65	13,51	0,78	1820,80	89,01
Planta 2 (estación 4)	371,93	7,94	6,91	12,38	0,97	923,03	1297,06

Ejemplo 2: Medidas adicionales

Para confirmar los resultados obtenidos en el sitio, se analizó también la acumulación de plomo en condiciones controladas (concretamente, en laboratorio en lugar de en el sitio). Se germinaron semillas de *Cistus libanotis* y se cultivaron *in vitro* en placas Petri que contenían medio Murashigue y Skoog ½ en cámara de crecimiento (25 °C (±3 °C), 16 horas de luz) durante 3 semanas. Se transfirieron entonces los plantones a tanques hidropónicos que contenían medio líquido de Broughton y Dillworth (BD, pH 6,6) y se cultivaron durante 2 semanas más. Se transfirieron entonces a medio líquido BD que contiene nitrato de plomo 1 mM y sin fosfato (para evitar la precipitación de plomo).

Se analizó entonces el contenido de plomo en 4 momentos diferentes (4 plantas/punto temporal) después de transferir a un medio que contiene plomo. Se secaron en estufa las plantas a 70 °C durante 48 horas antes del análisis. Se extrajeron los metales pesados totales mediante digestión con ácido nítrico-ácido perclórico. Se midieron los contenidos de metal, como en el ejemplo 1, por ICP-AES.

Las plantas *Cistus libanotis* eran capaces de crecer en medio BD que contenía nitrato de plomo 1 mM. El análisis de las muestras de planta (véanse los resultados presentados en la Tabla 3) mostró que estas plantas crecidas en medio que contiene plomo acumulaban rápidamente plomo en sus partes aéreas. La acumulación de plomo era superior al umbral que define plantas hiperacumuladoras de plomo (> 1000 mg/kg), confirmando por tanto el estado de hiperacumulación de esta planta.

Tabla III. Concentración de plomo (mg/kg) en plantas *Cistus libanotis* crecidas en medio BD que contiene plomo. Los valores son medias de 4 plantas por punto temporal.

Tiempo después de transferencia a medio que contiene Pb (días)	Pb en partes aéreas (mg/kg)
0	0
6	1577,98
14	14810,42

Ejemplo 3: Protocolo para una germinación eficaz de *Cistus libanotis*

5 Para determinar las mejores condiciones para una germinación eficaz de *Cistus libanotis*, se incubaron en primer lugar las semillas en agua a 25 °C, 50 °C o 100 °C durante 1 hora con agitación ocasional. Las semillas pueden germinarse entonces directamente en suelo o *in vitro*. Para la germinación *in vitro*, se esterilizaron las semillas usando lejía al 50 % (v/v) en agua durante 10 minutos, se aclararon 3 veces con agua estéril y se transfirieron entonces a placas Petri que contenían medio Murashigue y Skoog ½ a 25 °C (±3 °C) en condiciones de día largo (16 horas de día, 8 horas de noche). Como puede observarse en la Figura 1, se encontró que el tratamiento a 100 °C aumentaba en gran medida la tasa de germinación.

10 **Otras realizaciones**

Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva o la práctica de la invención dada a conocer en la presente memoria. Se pretende que la memoria descriptiva y ejemplos sean considerados solo ejemplares, estando indicado el verdadero alcance de la invención por las siguientes reivindicaciones.

15

REIVINDICACIONES

1. El uso de *Cistus libanotis* para la fitocorrección de plomo.
2. El uso de *Cistus libanotis* según la reivindicación 1 para la fitoextracción de plomo.
3. El uso de *Cistus libanotis* según la reivindicación 1 para la fitoestabilización de plomo.
- 5 4. Un método de fitocorrección que comprende una etapa de:
cultivar una planta *Cistus libanotis* en un medio contaminado que contiene una cantidad excesiva de plomo en condiciones en que la planta acumule plomo, con lo que se reduce el contenido de plomo del medio, caracterizado por que la planta es *Cistus libanotis*.
- 10 5. El método de fitocorrección según la reivindicación 4, en el que la planta *Cistus libanotis* se cultiva a partir de una semilla y en el que, antes de la germinación, se incuba la semilla en agua a 100 °C durante 1 hora con agitación ocasional.
6. El método según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el medio contaminado es suelo contaminado y el contenido de plomo del suelo contaminado es mayor de 50 mg/kg.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende adicionalmente una etapa de:
15 añadir un agente quelante biodegradable al medio contaminado en que se cultiva la planta *Cistus libanotis*.
8. El método según la reivindicación 7, en el que el agente quelante biodegradable se selecciona del grupo consistente en diacetato de metilglicina (MGDA), ácido etilensuccínico (EDTS), diacetato del ácido L-glutámico (GLDA), diacetato del ácido L-aspártico (ASDA); cualquiera sal de los mismos y cualquier mezcla de los mismos.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, que comprende adicionalmente una etapa de:
20 recolectar la planta *Cistus libanotis* que ha acumulado plomo.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en el que, en el momento de la recolección, la planta *Cistus libanotis* ha acumulado una concentración de plomo de al menos 1000 mg/kg.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, que comprende adicionalmente las etapas de:
incinerar la planta *Cistus libanotis* recolectada obteniendo cenizas que contienen plomo; y
25 tratar las cenizas obtenidas.
12. El método según la reivindicación 11, en el que las cenizas obtenidas se tratan por vitrificación con un arco de plasma, con lo que el plomo se vuelve inerte.

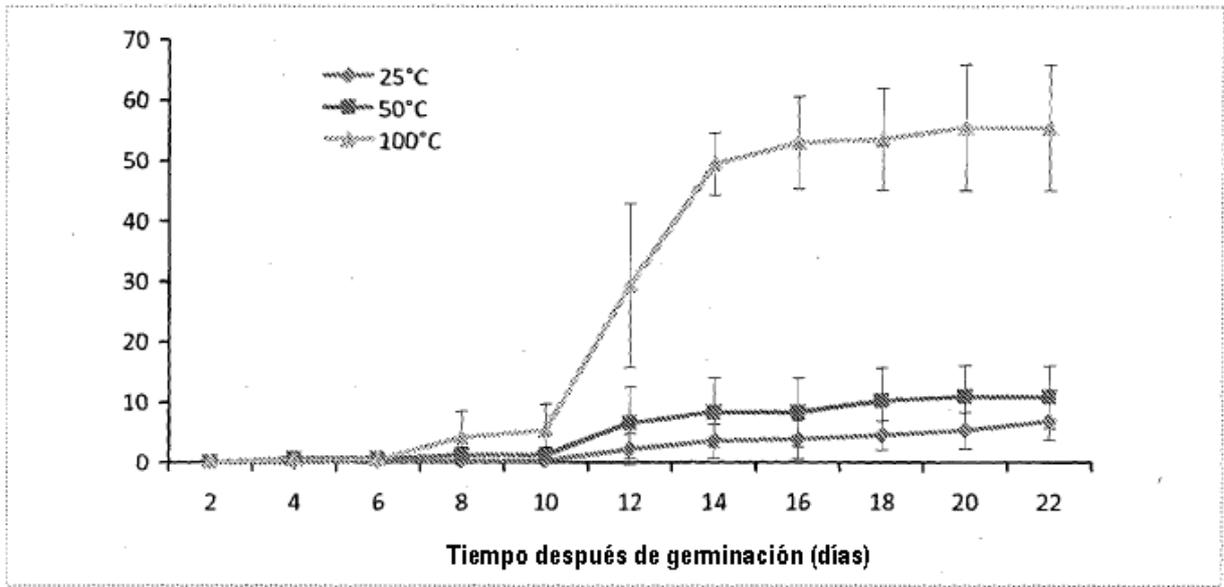


Figura 1