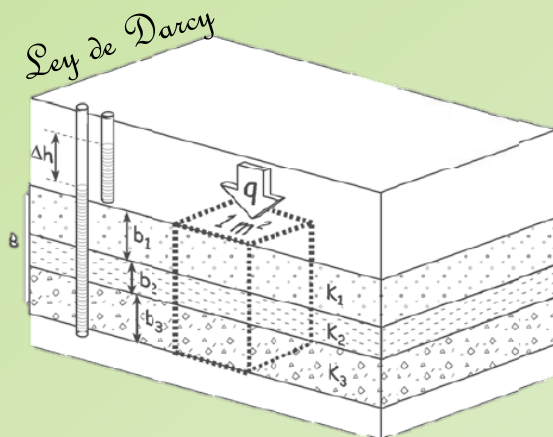




ESCALAMIENTO

BR ➡ **MDV**

TRL4 ➡ **TRL6**

Producto 6: Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico.

Nota Técnica: Diez herramientas y metodologías diseñadas para escalamiento ingenieril TRL 6 en MDV.

Adalgisa Scotti, Vanesa Silvani, Gabriela Coria, Andrea Juarez, Inmaculada García Romera, Alicia Godeas, María Luisa Izaguirre Mayoral – Año: 2024



FONTAGRO



Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Adalgisa Scotti, Vanesa Silvani, Gabriela Coria, Andrea Juarez, Inmaculada García Romera, Alicia Godeas, María Luisa Izaguirre Mayoral.

Copyright © 2025 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org

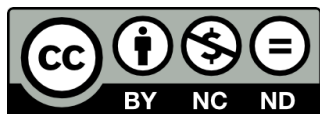


Tabla de Contenidos

Resumen.....	4
Abstract	5
Resumen Ejecutivo	6
Introducción	7
Objetivos	10
Metodología	10
Parámetro físicos-hidráulicos	10
Parámetros químicos-biológicos.....	11
Resultados	12
Discusión.....	15
Conclusiones y recomendaciones.....	17
Referencias Bibliográficas	18
Instituciones participantes.....	20



RESUMEN

En esta Nota Técnica (NT) se presentan las variables que deben ajustarse durante el proceso de escalamiento de los biorreactores (BR), que cuentan con un nivel de maduración tecnológica (TRL) 4, hacia el Módulo de Depuración Vegetal (MDV), con un TRL 6. Un BR tiene un volumen 100 veces menor que un MDV. Las variables y sus rangos de valores fueron definidas como parámetros, mientras que aquellos parámetros validados a TRL 4 y escalados a TRL 6 fueron llamados herramientas y metodologías diseñadas para el escalamiento ingenieril.

El escalamiento progresivo facilita la experimentación a baja escala, permitiendo registrar las variables y sus respectivos rangos de valores. Esto garantiza que, al momento de escalar la innovación tecnológica, en este caso el bioproceso, se utilicen los parámetros generados del protocolo a TRL 4, y se apliquen en TRL 6 como herramientas de escalamiento.

Para que este escalamiento sea comparable, es necesario determinar las variables y fijar los parámetros que deben mantenerse constantes durante el proceso. Alcanzar un TRL 6 antes de avanzar la implementación a territorio (TRL 7) es necesario para evitar errores habituales que han surgido en otras transferencias tecnológicas, donde se ha pasado directamente de pruebas de concepto (TRL 1-2) al territorio (TRL 7), sin un escalamiento progresivo que permita ajustar adecuadamente los parámetros. Desde el punto de vista ingenieril, un MDV es un módulo de humedal artificial modificado que permite obtener un resultado a partir de la innovación testeada en escalas menores durante la puesta en marcha a TRL 6. A partir de este módulo, se obtiene un protocolo de salida que permite su aplicación a territorio. En este sentido, el MDV puede considerarse un desarrollador tecnológico en un entorno simulado, pero a gran escala.

Los pasos previos del ajuste en el MDV resultan complejos. Por esta razón, se trabaja con BR que representan una sección longitudinal del MDV, y con la misma profundidad y nivel de pendiente. El movimiento de fluidos a través de los BR y el MDV se rige por la Ley de Darcy. Las variables a escalar incluyen: 1- tipo de irrigación, 2- caudal de ingreso y egreso, 3- tiempo de retención de salida a cámara colectora, 4- constante de permeabilidad, 5- volumen de sustrato y filtro de piedras, 6- capacidad de retención de agua, 7- porosidad, 8- velocidad de Darcy y promedio de velocidad lineal, 9- sistema simbiótico (verificado por la estimación de la colonización radicular: intensidad y frecuencia), producción de glomalina (fracción total y fácilmente extraíble), 10- oligo y macroelementos esenciales y contaminantes, pH, Eh, sustancias químicas exudadas y materia orgánica. Estas variables fueron fijadas en distintos experimentos, verificándose la similitud y/o proporcionalidad entre los BR y el MDV. Se concluyó que el valor de partición de los elementos químicos en las distintas fases fue predecible al pasar de BR a MDV cuando se respetaron los parámetros físicos-(hidráulicos)-químico-biológicos (CF_{HQB}), previamente señalados como herramientas y metodologías para el escalamiento ingenieril.



ABSTRACT

This Technical Note (TN) outlines the variables that must be adjusted during the scaling process of bioreactors (BR), which currently have a Technology Readiness Level (TRL) of 4, as they progress toward the Vegetable Depuration Module (VDM) with a TRL of 6. A BR is 100 times smaller in volume than an VDM. The variables, along with their value ranges, were defined as parameters, while those validated at TRL 4 and scaled to TRL 6 were referred to as tools and methodologies for engineering scaling.

The reason for working with progressive scaling is to carry out low-scale experimentation, where the variables and the range of values are recorded, so that when scaling up the technological innovation, in this case the bioprocess, the parameters generated from the protocol to TRL 4 are used and applied to TRL 6 as scaling tools.

For this scaling process to be comparable, it is essential to identify the variables and establish the parameters that must remain equal or proportional throughout the process. Achieving TRL 6 is necessary before advancing to territory (TRL 7), to avoid the errors observed in previous technology transfers, where the process skipped from proof of concept (TRL 1-2) directly to implementation (TRL 7), without the benefit of progressive scaling to adjust variables and parameters effectively. From an engineering perspective, an VDM is a modified artificial wetland module designed to assess the performance of innovations during start-up. It generates an output protocol that facilitates its application in territory. The VDM can be considered a large-scale technological development platform within a simulated environment.

The prior adjustments to the VDM are complex, which is why BRs are used as representative models. These BRs simulate a longitudinal section of the VDM, with the same depth and slope. The movement of fluids through both BRs and the VDM is governed by Darcy's Law. The variables to be scaled include: 1) type of irrigation, 2) inlet and outlet flow rates, 3) retention time at the outlet chamber, 4) permeability constant, 5) substrate and stone filter volume, 6) water retention capacity, 7) porosity, 8) Darcy velocity and average linear velocity, 9) symbiotic system (quantification of root colonization rates: intensity and frequency), glomalin production (mg total and easily extractable glomalin), 10) essential and contaminating trace and macroelements present, pH, Eh, exuded chemical substances, and organic matter. These variables were set through various experiments, confirming the similarity and/or proportionality between BRs and the VDM. The findings concluded that the partitioning of chemical elements across different phases remained predictable when scaling from BR to VDM, provided by the physical-(hydraulic)-chemical-biological parameters (CF_{HQB}), previously identified as tools and methodologies for engineering scaling.



RESUMEN EJECUTIVO

La maduración tecnológica (TRL por sus siglas en inglés) de una innovación biotecnológica puede ser clasificada en nueve niveles. TRL 1-2 se refiere a los primeros experimentos realizados para demostrar una prueba de concepto, TRL 3-4-5 se refiere a desarrollos que están siendo probados a baja escala con las condiciones e insumos controlados, en presencia de blancos y con pruebas de hipótesis, pero con la presencia de factores ingenieriles de transferencia. El TRL 6 se refiere a pruebas piloto o prototipos puestos en entornos simulados, ya sin blancos y a mayor escala o en sistemas modulables capaces de ser escalables a territorio, mientras que los TRL 7-9 son los desarrollos puestos en territorio, reproducibles y ajustados. El escalamiento ingenieril es un aspecto fundamental para el éxito de la transferencia de los desarrollos a territorio.

En el proyecto *Bioproceso reductor de la solubilidad de cadmio rizosférico* se calibró una biotecnología de fito-mico-remediación que fue probada inicialmente a TRL 1-3, y luego se avanzó a TRL 4 utilizando biorreactores (BR). El pasaje de los BR (TRL 4) a un módulo de depuración vegetal (MDV) a TRL 6, se llevó a cabo teniendo en cuenta los parámetros CF_{HQB}, que deben mantenerse constantes o proporcionales para garantizar la reproducibilidad de los resultados. En este trabajo se detallan las diez herramientas y metodologías diseñadas para un escalamiento ingenieril a TRL 6 en MDV, a saber: 1- tipo de irrigación, 2- caudal de ingreso y egreso, 3- tiempo de retención de salida a cámara colectora, 4- constante de permeabilidad, 5- volumen de sustrato, y filtro de piedras, 6- capacidad de retención de agua, 7- porosidad, 8- velocidad de Darcy y promedio de velocidad lineal, 9- sistema simbiótico: colonización radicular (intensidad y frecuencia), producción de glomalina (total y fácilmente extraíble), 10- oligo y macroelementos presentes, esenciales y contaminantes, pH, Eh, sustancias químicas exudadas y materia orgánica. Para el correcto escalamiento desde TRL 4 a TRL 6 se mantuvieron en valores similares los parámetros 1, 3, 4, 6, 7, 9 y 10, mientras que los parámetros 2, 5, y 8 fueron proporcionales teniendo en cuenta que 100 BR: 1 MDV en volumen, siendo la altura y la pendiente la misma tanto de BR como de MDV, de modo tal que 1 BR es un corte transversal del MDV. La aplicación de estas diez herramientas metodológicas en la fase de escalamiento permite inferir que la partición de metal(oid)es en suelo/biomasa/lixiviado, entre ellos el Cd, será reproducible al cambiar de TRL 4 a TRL 6. Sin embargo, cualquier alteración de alguno de estos parámetros mostrará resultados diferentes, ya que podría cambiar la biodisponibilidad de los elementos químicos frente al bioproceso reductor de la solubilidad de Cd rizosférico propuesto en este proyecto.

Palabras Clave: escalamiento – bioproceso – trl 4 – trl 6- biorreactores- mdv

INTRODUCCIÓN

El ingreso de líquido a los BR y MDV fue mediante flujo vertical a baja velocidad para mantener el flujo laminar de ingreso. A mayor velocidad, predomina el flujo turbulento, lo que impide que se cumple la Ley de Darcy (ecuación 1 y ecuación 2):

$$K_s = Q / (A_c \times s) \quad V_D = Q / A_c \quad (\text{ecuación 1 y ecuación 2})$$

Donde K_s es la constante de permeabilidad hidráulica, Q es el promedio del caudal de ingreso y egreso a cámara colectora, A_c es el área perpendicular al flujo del líquido, s es la pendiente y V_D es la velocidad de Darcy.

Además, se registró el tiempo de retención hidráulico (t_c) en BR y el MDV, como el tiempo que tardó el efluente en atravesar las diferentes capas del lecho filtrante más sustrato (cenizas + suelo) y salir hacia la cámara colectora cuando una película de 1 cm cubría la última capa superficial de sustrato, tanto en el BR como en el MDV al inicio del experimento, antes que se formen los canales y microcanales de riego en el sustrato.

La *Velocidad de Darcy* (V_D) es la calculada a partir del caudal y la sección transversal, aunque conocida, no representa la velocidad real del flujo. Esto se debe a que el agua no circula por toda la sección del permeámetro, sino solo por una parte de ella. Esta velocidad teórica, que correspondería al flujo si el agua atravesara toda la sección del medio poroso y se expresa mediante la ecuación 2

La parte porosa de la sección total por la que puede circular el agua en el suelo o sustrato es la porosidad eficaz (ϕ). Si un sustrato arenoso presenta una porosidad del 10% (0,10), el agua estaría circulando por el 10% de la sección que atraviesa el agua. Para que el mismo caudal circule por una sección 10 veces menor, su velocidad será 10 veces mayor. Por tanto, se cumplirá que:

$$\text{Velocidad lineal media } (V_a) = \text{Velocidad Darcy } (V_D) / \phi \quad (3)$$

Es importante señalar que el flujo de Darcy no es igual a la velocidad del fluido, aunque se exprese en unidades de velocidad. La velocidad del fluido se alcanza a través de la velocidad lineal promedio (V_a), que es el promedio de la velocidad de todos los caminos posibles del fluido a través del medio poroso (ecuación 4).

$$\phi = V_{\text{void}} / V_{\text{tot}} \quad (\text{ecuación 4})$$

donde ϕ es la porosidad eficaz y V_D es la velocidad del fluido. La porosidad (ϕ) se calcula como la relación entre el volumen del espacio vacío y el volumen total de un material.

La porosidad eficaz (ϕ) fue calculada como el volumen recuperado en la cámara colectora (V_{void}) dividido por el volumen total ingresado al BR (V_{tot}), y generalmente es expresado como



una fracción entre 0 y 1 o porcentaje.

La capacidad de retención de agua (WHC) es el porcentaje (o fracción) de agua que queda retenido en el suelo luego de ser saturado. Para registrarla se agrega un volumen de agua al BR y se espera la salida a la cámara colectora bajo presión atmosférica. Cuando ya no hay más drenaje, se determina el peso húmedo del suelo, el volumen total (V_t) de suelo en el contenedor (BR y MDV), la densidad aparente de suelo seco (sin compactar) y suelo húmedo (post drenaje), y se lleva a secado el suelo húmedo hasta peso constante. Con los valores obtenidos se aplican las siguientes fórmulas:

$$M_{H_2O} = M_t - M_s$$

$$M_{H_2O} \text{ (Kg)} = V_{H_2O} \text{ (L)}$$

$$\text{WHC \%} = V_{H_2O} / V_t * 100 \text{ (ecuación 5 expresado como porcentaje)}$$

$$\text{WHC} = V_{H_2O} / V_t \text{ (expresado como fracción)}$$

Donde, M_{H_2O} es la masa de agua en kilogramos (Kg), M_t es la masa total del suelo húmedo en el contenedor en Kg, y M_s es la masa total de suelo seco en el contenedor en Kg.

La densidad aparente del suelo es el peso de un determinado volumen de suelo seco sin compactar:

Densidad aparente= Masa de suelo seco/ volumen de suelo sin compactar

La porosidad y la WHC son inversamente proporcionales.

Otra forma de determinar la capacidad de retención de agua que hemos calculado fue utilizando la M_s en lugar de V_t , es decir:

$$\text{WHC \%} = (M_t - M_s / M_s) * 100 \text{ (ecuación 6 expresado como porcentaje)}$$

Ambas ecuaciones 5 y 6 expresan el mismo significado.

El BR y el MDV se comportan como un humedal artificial subsuperficial modificado con un flujo vertical de entrada y un flujo de salida recogido en una cámara colectora (Figura 1). Durante el experimento de fito-mico-remediación, el volumen de efluente obtenido en la cámara colectora no fue significativo, ya que el riego se realizó considerando la humedad del sustrato registrada con sensores sumergidos en la capa superior.

En cuanto a las variables biológicas del sistema, la efectividad del sistema simbiótico puede evaluarse midiendo la colonización micorrícica arbuscular (MA), mediante los parámetros de intensidad y frecuencia de colonización en las raíces, y la cuantificación de glomalina (fracción total y fácilmente extraíble) del suelo rizosférico. La colonización micorrícica arbuscular en una planta fitorremediadora sugiere una mayor eficiencia en la recuperación de suelos contaminados, ya que optimiza la absorción de nutrientes y la resistencia al estrés en la planta micorrizada. A su vez, puede actuar inmovilizando los contaminantes en las estructuras fúngicas, o bien incrementando su translocación a la biomasa aérea de las plantas, dependiendo de las especies

o cepas involucradas. En el presente caso, se usan hongos MA con capacidades altas de captación y translocación de metal(oides).

La glomalina, glicoproteína producida por los hongos MA en el suelo, mejora las condiciones edáficas al promover el microbioma rizosférico y la agregación del suelo, lo que contribuye al desarrollo radicular y a la recuperación de los suelos degradados. Además, la glomalina cumple un rol importante en el secuestro de metales pesados, ya que los inmoviliza en el suelo y disminuye su lixiviación. Según el método de extracción, se pueden diferenciar dos tipos de glomalina: fácilmente extractable (EE-GRSP) y total (T-GRSP) (Tabla 1). Debido a su naturaleza recalcitrante, la separación de la glomalina del resto de las glicoproteínas del suelo se lleva a cabo mediante autoclavado en soluciones de pH neutro y básico, dependiendo de la fracción a extraer. Su cuantificación se realiza por espectrofotometría, utilizando una curva de calibración preparada con una proteína patrón.

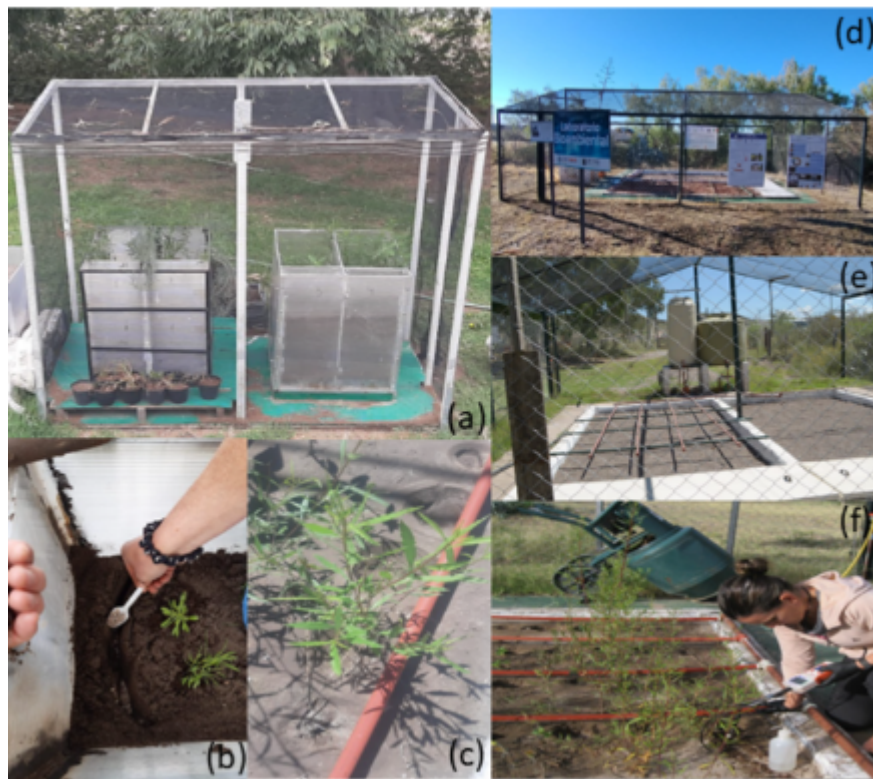


Figura 1. El Sistema fito-mico-remediador en Biorreactores (BR) (a-c) y Módulos de Depuración Vegetal (MDV) (d-f) usando plantas de *Baccharis salicifolia* y hongos formadores de la simbiosis micorriza arbuscular (a) en BR, con suelo blanco y suelo contaminado; (b) transplante en BR; (c) *B. salicifolia* en BR luego de 4 meses; (d) vista general de un MDV; (e) vista del sistema hidráulico del MDV; (f) sistema fito-mico-remediador en MDV en marcha.



OBJETIVOS

El objetivo de esta NT es describir diez herramientas y metodologías diseñadas para el escalamiento ingenieril del sistema fito-mico-remediador hasta TRL 6 en un MDV.

METODOLOGÍA

Parámetro físicos-hidráulicos

Todos los cálculos serán ajustados a la expresión teórica de la Ley de Darcy.

Los parámetros que se definen y pueden ser modificados son= Caudal de ingreso (Q_i); Caudal de egreso (Q_e); la porosidad (Φ). Por otro lado, existen parámetros que se definen en función de los previamente nombrados: Caudal promedio (Q); constante de permeabilidad (K_s); tiempo de retención (T_c); Capacidad de campo (WHC), Velocidad de Darcy (V_D) y Velocidad lineal promedio (V_a).

Caudal de ingreso y egreso

Para la calibración del sistema en BR y MDV se mide la constante de permeabilidad tomando el caudal de ingreso (Q_i) como la cantidad de agua necesaria para cubrir 1 cm la capa superficial de sustrato y se registra el tiempo en que desaparece el agua en superficie. El caudal de egreso (Q_e) se registra como la cantidad de agua que sale a cámara colectora en la unidad de tiempo.

Constante de permeabilidad

Para el cálculo de la constante de permeabilidad (k_s) aplicaremos la Ley de Darcy con la ecuación 1. El área perpendicular al flujo (A_c) en los MDV es 3 * 5 m mientras que en BR es de 0,3 * 0,5 m, y la pendiente (s) es de 0,06 (6%).

Porosidad

La porosidad (Φ) se mide al iniciar el experimento (luego de formarse los canales y microcanales de riego) como la relación entre el volumen registrado en la cámara colectora respecto del volumen ingresado en BR y MDV. Se realiza al inicio para que las raíces y los exudados producidos por las plantas y el bioma rizosférico no intervengan.

La porosidad (Φ) se calcula como el volumen recuperado en la cámara colectora dividido por el volumen total ingresado al BR y MDV.

La constante (K_s) y la porosidad (Φ) son parámetros físicos hidráulicos importantes que definen la escalabilidad entre BR y MDV. Para que el sistema se comporte a escala es necesario que sus K_s y Φ sean iguales.



Tiempo de retención

Se registra el tiempo que tarda el líquido en salir a cámara colectora al inicio del experimento antes de la formación de canales de riego. Este parámetro está influenciado por la porosidad (Φ), la permeabilidad (K_s) y la capacidad de retención de agua (WHC).

WHC Capacidad de retención de agua

Este parámetro se registra como el peso de una cantidad de sustrato saturado menos el peso de esa misma porción de sustrato seco (luego de secarse en estufa a 100°C durante 48 hs y comprobar peso constante) dividido el peso de la porción seca.

Parámetros químicos-biológicos

Colonización micorrícica arbuscular

Las plantas de *B. salicifolia* fueron inoculadas con hongos MA (llamadas M+) tal como se describe en Scotti *et al.* 2024, mientras que las plantas no inoculadas (llamadas M-) fueron el control. Las plantas crecieron en suelo contaminado con metal(oides) y en un suelo sin contaminación (tratamiento blanco).

Para determinar la colonización de las raíces por los hongos MA, se toma una submuestra de raíces de cada planta, previamente lavadas con agua corriente, y se sumergen en una solución de KOH (10%, p/v) durante 15 min a 90 °C. Tras descartar el KOH, las raíces se enjuagan con agua corriente, y se sumergen en HCl al 1% durante 5 min. Posteriormente, se tiñen con una solución de azul Tripán en ácido láctico (0,02%) durante 10 min a 90 °C. Por último, se descarta el colorante y las raíces se almacenan en solución ácido láctico:agua (1:1, VV) en oscuridad hasta su procesamiento. Para la determinación de la colonización micorrícica, se seleccionan al azar raíces teñidas y se colocan en portaobjetos 30 segmentos de 1 cm de longitud, los cuales se examinan bajo microscopio óptico con un aumento de 400×. El porcentaje de frecuencia de colonización (% F) se calcula como el porcentaje de segmentos de raíz que contienen alguna estructura MA (hifas, arbuscúlos, enrollamientos hifales o vesículas). El porcentaje de intensidad de colonización (% I) se estima clasificando los segmentos de raíz en diferentes clases de intensidad (1–20%, 21–40%, 41–60%, 61–80% y 81–100%), y el resultado se expresa como un porcentaje de la siguiente manera: $10v + 30w + 50x + 70y + 90z / (v + w + x + y + z)$, donde v, w, x, y y z son el número de raíces en cada clase.

Producción de glomalina

Para la determinación de glomalina, se toman muestras de suelo rizosférico de las plantas crecidas en el BR (o MDV) al final de la experiencia, y se almacenan a 4°C hasta su procesamiento. Para la extracción de glomalina fácilmente extractable (EE-GRSP), se autoclava (1,2 atm, 30 min) 1 gr de suelo seco en 8 mL de buffer citrato de citrato de sodio (pH 7,0), mientras que para la



extracción de glomalina total (T-GRSP), se autoclava repetidamente 1 gr suelo seco en 8ml de buffer citrato 50mM (pH 8), centrifugando después de cada ciclo (3000 rpm, 15 min). Se recolectan los sobrenadantes tras cada autoclave hasta que la extracción adquiriera una coloración rojiza. Las muestras se almacenan a 4 °C hasta su medición.

Las concentraciones de EE-GRSP y T-GRSP (mg por g de suelo seco) se determinan mediante el método de Bradford, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis SP-2000 (Metertech Inc. Taipei, Taiwán) a 595 nm, y utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MI, EE. UU.). Para los cálculos de la Tabla 2 se registró la cantidad de EE-GRSP y T-GRSP en BR y su extrapolación al MDV teniendo en cuenta el volumen total de sustrato en el MDV (2.25 m³) y la densidad del sustrato seco ($\delta_s = 1.2924 \cdot 10^6 \text{ g/ m}^3$). Cabe destacar que el método de extracción y cuantificación es inespecífico, ya que aún no se ha desarrollado un procedimiento que permita obtener glomalina pura. Por ello, se estima un conjunto de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (*Glomalin Related Soil Proteins*, GRSP).

pH y ORP

Son parámetros que se miden con el instrumental requerido y es posible registrarlo al inicio, durante y final del experimento.

RESULTADOS

Con el fin de que sean extrapolables los resultados de escalas inferiores a superiores, los parámetros mencionados en la Tabla 2 deben mantener la relación entre BR y MDV, con una relación de volumen de 100:1 y una relación de superficie de 10:1, garantizando al mismo tiempo que la constante de permeabilidad (Ks) se mantenga similar en ambos niveles de escalamiento. En particular, el parámetro de micorrización en los BR (Figura 2), es decir, medidos en el tratamiento inoculado (M+) o sin inocular (M-), fue comparado con valores obtenidos en un ensayo en MDV. Se esperaba que los valores de %F y %I se mantengan en el escalamiento, dado que las condiciones de crecimiento y ambientales son las mismas. En la Figura 2, se muestran los resultados de ambos parámetros en BR, observando que las plantas inoculadas (M+) en suelo contaminado poseen mayor % F y % I que las plantas no inoculadas (M-). El tratamiento blanco permite constatar la efectividad del inóculo, siendo mayor la colonización en aquellas plantas inoculadas. En cuanto a la micorrización de las plantas de *B. salicifolia* inoculadas en el MDV creciendo en suelo contaminado, alcanzaron una frecuencia de $33.33 \pm 12 \%$ y una intensidad del $32.7 \pm 2.7 \%$ (media $\pm$ el error estándar). Siendo levemente menor en el MDV.

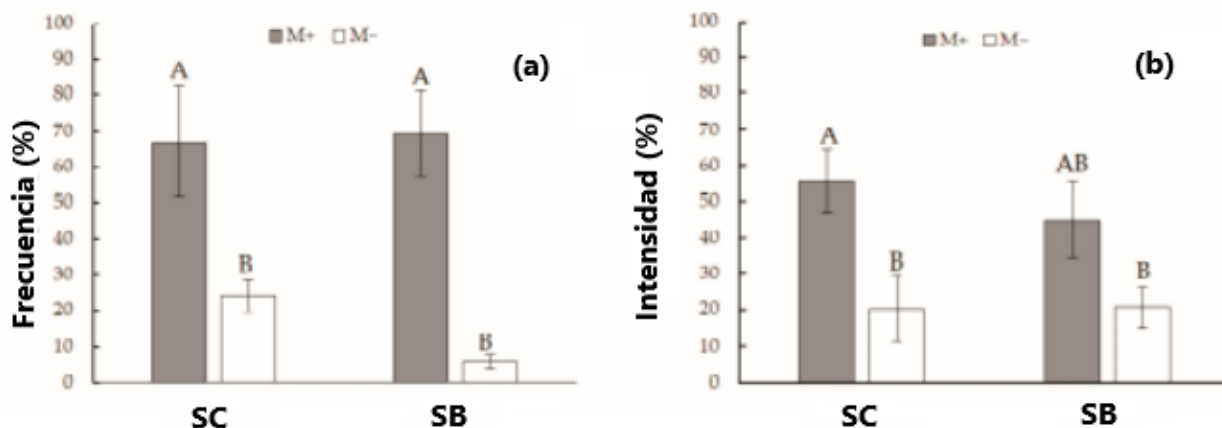


Figura 2. Porcentaje de frecuencia (a) e intensidad (b) de raíces colonizadas de micorrizas arbusculares en plantas inoculadas (M+) y no inoculadas (m-), con una mezcla de especies de AM cuando crecieron en suelo contaminada (SC) y suelo blanco (SB) en BR. Los valores corresponden a la media $\pm$ el error estándar. Las letras indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$)

En cuanto a la producción de glomalina en los BR, se observó una tendencia a una mayor producción de EE-GRSP en los suelos contaminados de los tratamientos inoculados (M+) que los no inoculados (M-). Asimismo, la producción de T-GRSP fue significativamente mayor en tratamientos M+ que en los M-, siendo estadísticamente significativo en suelos contaminados. Tal resultado es esperable, dado la eficiencia del inóculo de HMA utilizado y del sistema aplicado. La alta producción de glomalina en BR, y su extrapolación al MDV, estaría indicando una mejora en las propiedades edáficas, y posible interacción con los metal(oid)es. En el ensayo realizado en el MDV con plantas de *B. salicifolia* inoculadas crecidas en suelo contaminado, se obtuvieron valores equivalentes de EE-GRSP y TG-GRSP que en los BR, corroborando las extrapolaciones realizadas en esta NT (Tabla 1).

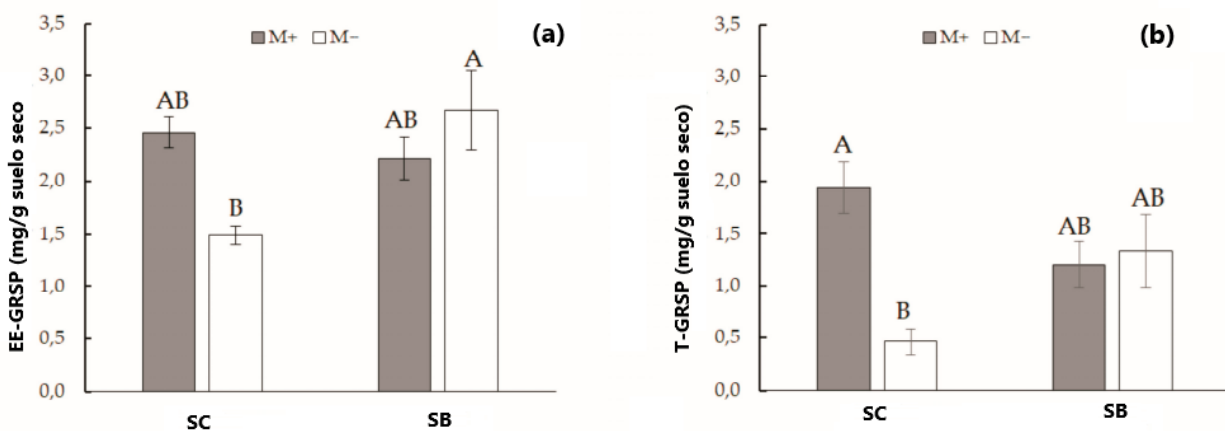


Figura 3 Concentración de glomalina fácilmente extraíble (EE-GRSP) (mg EE-GRSP por g de suelo seco (a) y proteínas del suelo relacionadas con la glomalina total (T-GRSP) (mg de T-GRSP por g de suelo seco) (b) desde la rizosfera de las plantas inoculadas (M+) y no inoculadas (M-), con una mezcla de especies de AM cuando crecieron en suelo contaminada (SC) y suelo blanco (SB) en BR. Los valores corresponden a la media $\pm$ el error estándar. Las letras indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$).

En la Tabla 1 puede observarse el aumento de la concentración de glomalina desde el tiempo inicial al tiempo final del experimento.

Tabla 1. Concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles (EE-GRSP) y total (T-GRSP) (mg por gr suelo seco) en el módulo de depuración vegetal (MDV) bajo el tratamiento de suelo contaminado y la inoculación de hongos MA en *Baccharis salicifolia*.

GRSP en MDV		
	T (mg g ⁻¹ suelo)	EE (mg g ⁻¹ suelo)
Suelo T0	1.38 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.01
<i>B. salicifolia</i> TF	1.54 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.02
Suelo TF cerca colectora	1.69 $\pm$ 0.10	0.39 $\pm$ 0.02

Los valores corresponden a la media $\pm$ el error estándar. Suelo T0: concentración de GRSP al inicio del experimento; TF: Final de la experiencia; Suelo TF: GRSP en suelo recolectado cercano a la cámara colectora.



En la tabla 2 se encuentran los datos calculados en BR para suelo contaminado, y en MDV los resultados esperados cuando ambos sistemas se encuentran escalados.

Tabla 2. Constantes hidráulicas, parámetros fisicoquímicos y cantidad de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles (EE-GRSP) y proteínas del suelo relacionadas con la glomalina total (T-GRSP), medidos en los biorreactores (BR) y extrapolados al módulo de depuración vegetal (MDV) bajo el tratamiento de suelo contaminado y la inoculación de hongos micorrízico arbusculares. MDVt es el valor calculado teórico y MDVe es el valor experimental.

	Qi	Qe	Q	Ks	Tc	V _D	Va	Φ	WHC	pH	Eh	GRSP	
	(m ³ /d)	(m ³ /d)	(m ³ /d)	(m ³ /d*m ²)	(min)	(m/d)	(m/d)					T (g)	EE (g)
BR	2.64	0.83	1.74	192.9	32	11.57	28.94	0.40	0.14	7.1	256	0.054	0.071
MDV _t	264	83	174	193	32	11.57	28.94	0.40	0.14	7.1	256	5641	7150
MDV _e	280	112	196	218	45	13,06	32.28	0.36	0.15	6.8	225	4914	1134

Qi: flujo de ingreso; Qe: flujo de egreso, Q: promedio Qi - Qe; Ks: constante de permeabilidad; Tc: tiempo de retención de líquido antes de salida a cámara colectora; V_D: velocidad de Darcy; Va: velocidad linear promedio; Φ: porosidad; WHC: capacidad de agua del sustrato; pH: medición de acidez; Eh: potencial redox; T-GRSP: proteínas del suelo relacionadas con la glomalina total; EE-GRSP: proteínas del suelo relacionadas con la glomalina fácilmente extraíbles.

Como se mencionó con anterioridad caudal y porosidad deben mantenerse en ambos sistemas para que los parámetros físico-químicos, biológicos e hidráulicos no varíen al cambiar de BR a MDV.

DISCUSIÓN

En esta NT se determinó que las herramientas y metodologías planteadas, bajo los parámetros CF_{HQB}, fueron importantes para el escalamiento del sistema fito-mico-remediador desde TRL 4 a TRL 6. En este sentido, de Aldecoa Quintana (2014) señaló la importancia de realizar evaluaciones a escalas piloto (TRL 6), remarcando su importancia para no fracasar a mayor escalamiento en territorio (TRL 7). La vinculación entre el tiempo de retención hidráulico y la lixiviación fue discutido por Xu y colaboradores (2022), en donde simularon un humedal artificial con ingreso de agua en forma de flujo vertical para analizar la salida de metal(oid)es utilizando BR con plantas



micorrizadas. Los autores también destacaron la importancia del sistema de llenado, la permeabilidad y porosidad del sustrato usado. En este sentido, consideramos importante mantener los parámetros elegidos (CF_HQB) dentro de las condiciones exigidas por la ley aplicable, en este caso la Ley de Darcy. En este escalamiento consideramos el flujo vertical laminar con aireación en el momento de la entrada de agua, aplicando ley de Darcy en el VDM, tal como se describe en Scotti y colaboradores (2019).

El comportamiento de un humedal artificial depende principalmente de la hidráulica, la química y la permeabilidad del sustrato (Guittonny-Philippe *et al.* 2014). Un obstáculo frecuente que aparece en los humedales artificiales es el suministro inadecuado de oxígeno. Las condiciones de anoxia pueden ser condiciones estresantes para determinadas especies de plantas y los microorganismos implicados en el proceso remediador, y puede disminuir la eficiencia de la reducción del metal(oides) (Akratos & Tsihrintzis 2007, Mena *et al.* 2008). Las CF_HQB propuestas para el funcionamiento del MDV, que favorecen un ambiente aeróbico y la eliminación de metal(oides), incluyen: el flujo de irrigación vertical (Mena *et al.* 2008), valores potenciales de redox y pH apropiados (Husson 2013), una alta densidad de biomasa de raíces, y el desarrollo efectivo de los HMA en raíces y en el sustrato (Göhre & Paszkowski 2006). Todas herramientas y metodologías planteadas aquí fueron apropiadas para el escalamiento y la reproducibilidad del sistema fito-mico-remediador.

En esta NT se demuestra que la inoculación con cepas efectivas de hongos MA en plantas de la especie *B. salicifolia* crecidas en BR y MDV mantiene su funcionalidad durante el escalamiento. Además, contar con un tratamiento blanco en escalas menores (TRL4) resulta importante, ya que se ha comprobado que la inoculación de plantas con cepas resistentes a metal(oides) representa una estrategia superadora en comparación con la micorrización por hongos ya presentes en el suelo (Scotti *et al.* 2024). En cuanto al parámetro de la concentración de glomalina, los resultados obtenidos en ambos sistemas (BR y MDV) fueron semejantes, lo que evidencia la efectividad del sistema en el escalamiento. Esta medición es importante de estimar ya que la glomalina está involucrada en el secuestro de metal(oides), al inmovilizarlos en el suelo, y reducir su biodisponibilidad, y por lo tanto menor toxicidad en la planta. Identificar el consorcio adecuado de planta hospedante y hongo MA es clave para optimizar la eficiencia en la fito-mico-remediación (Colombo *et al.* 2024). En este sentido, el consorcio de *B. salicifolia* y HMA resistentes a metales pesados, resulta ser un candidato prometedor para la aplicación de nuestra tecnología. Por lo general, una alta tasa de colonización micorrícica se correlaciona positivamente con la producción de glomalina en el suelo (Zhang *et al.* 2022). En nuestro caso, los tratamientos con plantas inoculadas presentaron más contenido de glomalina en suelos contaminados. Otro de los principales mecanismos de los hongos MA que limita la biodisponibilidad de metal(oides), es la acumulación de estos elementos en sus propias estructuras (esporas y micelio) (Benavidez *et al.* 2024). Los mecanismos mencionados pueden impactar en la disminución de la concentración de estos elementos en el suelo y en su lixiviación. La biomasa del sistema fito-mico-remediador es un importante factor para tener en cuenta en futuras experimentaciones, y en el



estudio de la lixiviación de ciertos elementos.

En nuestros experimentos se tomaron muestras de líquido recolectas en la cámara colectora al final y a la mitad del experimento para evaluar la lixiviación y estimar el impacto ambiental en la contaminación de suelo y la cuenca hídrica. Hemos observado que la concentración de determinados elementos varió tanto en condiciones de inoculado y sin inocular, dependiendo también del elemento en cuestión. En este trabajo, hemos observado que algunos elementos pueden ser recuperados (extraídos en biomasa) desde el MDV bajo condiciones controladas de CF_HQB (Scotti *et al.* 2019). Por otra parte, al cambiar las CF_HQB, esos mismos elementos pueden ser estabilizados en el suelo (Colombo *et al.* 2024) debido a los mecanismos involucrados en el ingreso de estos elementos dentro de los microorganismos y las raíces, entre ellos la biodisponibilidad en el suelo, impactando en su lixiviación. Durante nuestros experimentos, tomamos muestras de líquidos recolectados en una cámara colectora al final y a la mitad del experimento para evaluar la lixiviación y estimar el impacto ambiental en la contaminación del suelo y la cuenca hídrica. En este trabajo, se encontró que algunos elementos pueden ser recuperados (extraídos en la biomasa) del MDV bajo condiciones controladas de CFHQB (Scotti *et al.*, 2019). Sin embargo, al modificar las CFHQB, esos mismos elementos pueden estabilizarse en el suelo (Colombo *et al.*, 2024), debido a los mecanismos que permiten su entrada en los microorganismos y las raíces, entre los que se incluyen la biodisponibilidad en el suelo, lo que influye en su lixiviación. En trabajos anteriores encontramos diferencias significativas en el lixiviado de Ni y P a cámara colectora en BR cuando *B. salicifolia* estaba inoculada con una mezcla de cepas de hongos micorrícicos provenientes de una mina argentina (Paramillos de Uspallata), mientras que el Cd no lixivió, disminuyó en el suelo, y aumentó significativamente en biomasa aérea (Scotti *et al.* 2024). Estos resultados podrían estar relacionados con la actividad microbiana que podría incrementarse en la micorrizósfera (zona del suelo bajo influencia de las raíces de las plantas y los hongos MA) debido a los cambios en la abundancia de microorganismos asociados con las hifas, tales como bacterias solubilizadoras de P y solubilizadoras de Ni (Becerra *et al.* 2011).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las variables que han de ser tenidas en cuenta para el escalamiento son: 1- tipo de irrigación, 2- caudal de ingreso y egreso, 3- tiempo de retención de salida a cámara colectora, 4- constante de permeabilidad, 5- volumen de sustrato, y filtro de piedras, 6- capacidad de retención de agua, 7- porosidad, 8- velocidad de Darcy y promedio de velocidad linear, 9- sistema simbiótico, registro de colonización radicular (intensidad y frecuencia), producción de glomalina (total y fácilmente extraíble), 10- oligo y macroelementos presentes, esenciales y contaminantes, pH, Eh, sustancias químicas exudadas y materia orgánica. Para el correcto escalamiento desde TRL 4 a TRL 6 se deben mantener en valores similares los parámetros 1, 3, 4, 6, 7, 9 y 10, mientras que los parámetros 2, 5, y 8 deben ajustarse de manera proporcional, teniendo en cuenta que 100 BR: 1 MDV en volumen.



La calibración de estas variables en TRL 4 utilizando BR permitió extrapolar las CF_{HQB} en MDV y el escalamiento del sistema fito-mico-remediador a TRL 6, siendo este nivel el paso previo para llevar la tecnología a territorio.

Al aplicar estas 10 herramientas metodológicas (CF_{HQB}) en la fase de escalamiento podemos inferir que la partición de metal(oid)es en suelo/biomasa/lixiviado, entre ellos el Cd, será reproducible al cambiar de TRL 4 a TRL 6. Sin embargo, con cualquier modificación en alguno de estos parámetros se obtendrán posiblemente resultados diferentes al cambiar la biodisponibilidad de los elementos químicos frente al bioproceso reductor de la solubilidad de Cd rizosférico propuesto en el proyecto.

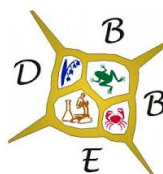
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akratos, C.S.; Tsihrintzis, V.A. (2007). "Effect of temperature, HRT, vegetation and porous media on removal efficiency of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands". *Ecological Engineering* 29(2), 173-91. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.06.013>.
- Becerra-Castro, C.; Prieto-Fernández, A.; Alvarez-Lopez, V.; Monterroso, C.; Cabello-Conejo, M.I.; Acea, M.J.; Kidd, P.S. (2011). "Nickel solubilizing capacity and characterization of rhizobacteria isolated from hyperaccumulating and non-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium*". (2011) *International Journal of Phytoremediation* 13(1), 229-244. [doi: 10.1080/15226514.2011.568545](https://doi.org/10.1080/15226514.2011.568545).
- Benavidez, M.E.; De La Fournière, E.M.; Colombo, R.P.; Silvani, V.A.; Debray, M.E.; Scotti, A.; Godeas, A.M. (2024). "Micro PIXE mapping proves a differential distribution and concentration of trace elements in fungal structures of *Rhizophagus intraradices*". *Fungal Biology* 128(7), 2089-93. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2024.08.008>
- Colombo, R.P.; Silvani, V.A.; Benavidez, M.E.; Scotti, A.; Godeas, A.M. (2024). "Different behavior of two strains of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus intraradices* on *Senecio bonariensis* Hook. & Arn. against heavy metal soil pollution: a pilot-scale test". *International Journal of Phytoremediation* 26 (11), 1741–1748. <https://doi.org/10.1080/15226514.2024.2353389>.
- de Aldecoa Quintana, J. M. I. (2014). Niveles de madurez tecnológica: Technology readiness levels: TRLS: Una introducción. *Economía industrial* 393, 165-171.
- Göhre, V.; Paszkowski, U. (2006). "Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation". *Planta* 223(6), 1115-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0225-0>.
- Guittonny-Philippe, A.; Masotti, V.; Höhener, P.; Boudenne, J.L.; Viglione, J.; Laffont-Schwob, I. (2014). "Constructed wetlands to reduce metal pollution from industrial catchments in



- aquatic Mediterranean ecosystems: A review to overcome obstacles and suggest potential solutions". *Environment International Journal* 64, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.016>.
- Husson, O. (2013). "Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy". *Plant Soil* 362(1-2), 389-417. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1429-7>.
- Mena, J.; Rodriguez, L.; Nuñez, J.; Fernández, F.J.; Villaseñor, J. (2008). "Design of horizontal and vertical subsurface flow constructed wetlands treating industrial wastewater". *Water Pollution IX* (111), 555-564. [DOI:10.2495/WP080551](https://doi.org/10.2495/WP080551).
- Scotti, A.; Silvani, V.; Cerioni, J.; Visciglia, M.; Benavidez, M.; Godeas, A. (2019). "Pilot testing of a bioremediation system for water and soils contaminated with heavy metals: vegetable depuration module". *International Journal of Phytoremediation* 21(9), 899-907. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1583634>.
- Scotti, A.; Castaño Gañan, A. R.; Silvani, V. A.; Juarez, N. A.; Coria, G.; Utge Perri, S.; Colombo, R. P.; García Romera, I.; Izaguirre-Mayoral, M. L.; Godeas, A. M.; Ubaldini, S. (2024). "Biotechnological Tool for Metal(loids) Management with Multiple Approaches". *Metals Journal Preprints* 091719. <https://doi.org/10.20944/preprints202409.1719.v1>
- Xu, Z.; Li, K.; Li, W.; Wu, C.; Chen, X.; Huang, J.; Zhang, X.; Ban, Y. (2022). "The positive effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation and/or additional aeration on the purification efficiency of combined heavy metals in vertical flow constructed wetlands". *Environmental Science Pollution Research* 29, 68950–68964. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20759-0>.
- Zhang, J.; Li, J.; Ma, L.; He, X.; Liu, Z.; Wang, F.; Chu, G.; Tang, X. (2022). "Accumulation of glomalin-related soil protein benefits soil carbon sequestration: Tropical coastal forest restoration experiences". *Land Degradation & Development* 33(10), 1541–1551. <https://doi.org/10.1002/ldr.4192>.

INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org