

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERA “FRAY ROGELIO BACON”

MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y DESARROLLO SUSTENTABLE



**DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ADSORCIÓN Y ACUMULACIÓN
INTRACELULAR DE PLOMO (Pb^{+2}) EN *Salvinia biloba* Raddi (ACORDEÓN DE AGUA)**

Tesis

Para optar al título de:

MAGISTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y DESARROLLO SUSTENTABLE

WILFREDO TELLO ZEVALLOS

Directores:

Dr. LEONARDO MARTÍN PÉREZ

Dr. LUCAS MATÍAS SALVATIERRA

Rosario – Argentina

2016

DEDICATORIA

Para mi madre y mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Primero y principal estoy muy agradecido a mis directores de tesis, al Dr. Leonardo M. Pérez y al Dr. Lucas M. Salvatierra por haberme acogido en su grupo de investigación en el marco del proyecto “Estudio de las propiedades de la vegetación nativa aplicables a la biorremediación”. Asimismo porque confiaron en mí para la realización de este trabajo, porque me han enseñado, guiado, aconsejado, y tenido paciencia, y con quienes he pasado gran parte de mi tiempo durante el desarrollo de esta tesis. Quiero dar un agradecimiento especial al Dr. Lucas M. Salvatierra por haberme brindado las facilidades en el uso del laboratorio durante el trabajo de investigación. Ambos han sido generosos conmigo sin mostrar un mínimo de egoísmo. Son excelentes personas y profesionales a quienes agradezco de corazón.

A Braulio Irco, por haberme apoyado en la recolección de los especímenes de *Salvinia biloba* Raddi de los humedales del río Paraná.

Al Dr. Esteban I. Meza Torres por haberme apoyado en la identificación taxonómica de la especie *Salvinia biloba* Raddi.

Al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC) del Perú por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría.

A la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA) por haberme acogido en sus instalaciones durante mis estudios de maestría y durante el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Por último, y no por ello menos importante, agradezco a mi madre y a mis hermanos, que son lo más importante que tengo. Su amor incondicional es la piedra donde me apoyo en el camino.

ABREVIATURAS

ppm	:	Partes por millón (mg/L)
ppb	:	Partes por billón ($\mu\text{g/L}$)
rpm	:	Revoluciones por minuto (unidad de velocidad de rotación)
R^2	:	Parámetro estadístico igual a la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores obtenidos mediante la aplicación de un modelo matemático y los valores reales o experimentales
δ	:	Densidad
λ	:	Longitud de onda
K_1	:	Constante de velocidad de la cinética de primer orden (1/h)
K_2	:	Constante de velocidad de la cinética de segundo orden (L/mg.h)
C_i	:	Concentración inicial (mg/L)
FBC	:	Factor de bioconcentración
FAD	:	Factor de adsorción
FAI	:	Factor de acumulación intracelular
Pb^{2+}	:	Catión plomo II
bs	:	Biomasa seca
q_t	:	Capacidad de adsorción (mg/g) al tiempo t (h)
q_e	:	Capacidad de adsorción (mg/g) en el equilibrio
k_1	:	Constante de velocidad de adsorción de pseudo primer orden (1/h)
k_2	:	Constante de velocidad de adsorción de pseudo segundo orden (g/mg.h)
h	:	Velocidad inicial de adsorción (mg/g h)
q	:	Capacidad de adsorción (mg/g)
$q_{\text{máx}}$:	Capacidad máxima de adsorción (mg/g)
b	:	Constante de Langmuir relacionada a la energía de adsorción (L/mg)
C_e	:	Concentración del metal en la fase líquida en el equilibrio (mg/L)
K_F	:	Constante de Freundlich relacionada a la capacidad de adsorción [(mg/g)(L/mg) $^{1/n}$]
n	:	Constante de Freundlich relacionada a la intensidad de adsorción
V	:	Velocidad de acumulación intracelular al tiempo t (mgPb $^{2+}$ /g bs.h)
$V_{\text{máx}}$:	Velocidad máxima de acumulación intracelular (mgPb $^{2+}$ /g bs. h)
K_m	:	Concentración de Pb $^{2+}$ a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima de acumulación intracelular del metal (mg/L)

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Metales.....	1
1.1.1. Contaminación del ambiente por metales pesados.....	2
1.1.2. Vías de entrada de los metales pesados en los sistemas acuáticos.....	3
1.1.3. Efectos tóxicos de los metales pesados en la salud humana	5
1.1.4. Fuentes de metales pesados en el ambiente	7
1.2. Plomo (Pb).....	8
1.2.1. Estrés por plomo.....	8
1.2.2. Normativa vigente	11
1.2.3. El plomo y el ambiente.....	13
1.3. Fitorremediación.....	15
1.3.1. Fitodegradación	18
1.3.2. Fitoestabilización	19
1.3.3. Fitovolatilización.....	19
1.3.4. Fitoextracción.....	20
1.3.5. Rizodegradación	20
1.3.6. Fitofiltración.....	21
1.4. Sistemas basados en bioadsorbentes	22
1.5. Mecanismos de acumulación y tolerancia a metales pesados.....	23
1.5.1. Acumulación e hiperacumulación	23
1.5.2. Mecanismos de eliminación de contaminantes	25

1.6.	Cinética de la eliminación de contaminantes en una columna de agua.....	28
1.7.	Modelos matemáticos de cinética de bioadsorción.....	30
1.7.1.	Modelo de pseudo primer orden.....	31
1.7.2.	Modelo de pseudo segundo orden.....	32
1.8.	Modelos matemáticos de isotermas de adsorción.....	33
1.8.1.	Isoterma de Langmuir.....	34
1.8.2.	Isoterma de Freundlich.....	35
1.8.	Cinética de acumulación intracelular.....	36
1.9.	El género <i>Salvinia</i> y la captación de metales pesados.....	37
1.9.1.	Generalidades del género <i>Salvinia</i>	37
1.9.2.	Descripción botánica de <i>Salvinia biloba</i> Raddi.....	38
1.9.2.1.	Clasificación taxonómica de <i>Salvinia biloba</i> Raddi.....	39
1.9.3.	Acumulación de metales por especies del género <i>Salvinia</i>	40
II.	OBJETIVOS.....	45
2.1.	Objetivo general.....	45
2.2.	Objetivos específicos.....	45
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1.	Recolección de plantas acuáticas.....	46
3.2.	Caracterización taxonómica de la especie vegetal.....	46
3.3.	Cultivo de especies vegetales.....	47
3.4.	Evaluación de la capacidad fitorremediadora.....	47
3.4.1.	Cuantificación de Pb^{2+} en la columna de agua.....	50
3.4.2.	Cuantificación de Pb^{2+} adsorbido en la biomasa vegetal.....	50
3.4.3.	Cuantificación de Pb^{2+} acumulado intracelularmente.....	51

3.4.4.	Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Pb^{2+}	51
3.5.	Análisis estadístico	52
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1.	Eliminación de Pb^{2+} en muestras de agua sintética utilizando <i>Salvinia biloba</i> Raddi .	53
4.2.	Análisis de compartimentalización	59
4.3.	Evaluación del factor de bioconcentración (FBC), factor de adsorción (FAD) y factor de acumulación intracelular (FAI)	63
4.4.	Cinética y equilibrio de adsorción de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi	68
4.5.	Acumulación intracelular de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi	73
V.	CONCLUSIONES	79
VI.	PROPUESTAS A FUTURO	80
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Efectos nocivos de algunos metales en la salud humana	5
2. Fuentes antropogénicas de algunos metales pesados en el ambiente.....	8
3. Condiciones a las que debe ajustarse un efluente conteniendo Pb de acuerdo a la capacidad de dilución del cuerpo receptor.	12
4. Actividades desarrolladas en las empresas con el objetivo del cuidado del medio ambiente (1998-2001)	13
5. Principales obstáculos encontrados en las empresas para emprender acciones en materia de protección del ambiente (1998-2001).....	14
6. Porcentajes de eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua a distintos tiempos de exposición en sistemas en lotes operados con <i>Salvinia biloba</i> Raddi.....	55
7. Cálculo de las constantes de velocidad de eliminación de Pb^{2+} (K) en lagunas operadas con <i>Salvinia biloba</i> Raddi empleando dos modelos cinéticos.....	57
8. Constantes del modelo de cinética de pseudo primer orden y pseudo segundo orden para la adsorción de Pb^{2+} por <i>Salvinia biloba</i> Raddi.	71
9. Parámetros obtenidos a partir de los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich para el proceso de adsorción de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi.....	72
10. Parámetros cinéticos de la acumulación intracelular de Pb^{2+} por <i>Salvinia biloba</i> de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo biogeoquímico general de los metales pesados.....	4
2. Diferentes procesos involucrados en la fitorremediación.	17
3. Esquema de un sistema de bioadsorción basado en lagunas con plantas acuáticas.....	23
4. Representación esquemática de los diferentes sistemas de defensa que utilizan las plantas expuestas a metales/metaloideos..	27
5. Representación esquemática de <i>Salvinia biloba</i> Raddi.....	39
6. Mapa de la ubicación geográfica de la población natural de <i>Salvinia biloba</i> Raddi de la cual se recolectaron las muestras de biomasa vegetal utilizadas en el presente trabajo.....	49
7. Curvas de eliminación de Pb^{2+} (mg/L) en la columna de agua en sistemas por lotes operados con <i>Salvinia biloba</i> Raddi	54
8. Cinéticas de eliminación de Pb^{2+} (mg/L) en columna de agua empleando <i>Salvinia biloba</i> Raddi.....	56
9. Análisis de compartimentalización de Pb^{2+} en sistemas en lagunas en lote operadas con <i>Salvinia biloba</i> Raddi.	61
10. Distribución de Pb^{2+} en los tres compartimentos definidos al tiempo final (24 h) de exposición de <i>Salvinia biloba</i> Raddi a las distintas C_i del metal evaluadas.	62
11. Factor de bioconcentración (FBC) de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.	63
12. Factor de adsorción (FAD) de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.....	66

13. Factor de acumulación intracelular (FAI) de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.	67
14. Adsorción de Pb^{2+} por <i>Salvinia biloba</i> Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.	69
15. Acumulación intracelular de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi.	74
16. <i>Salvinia biloba</i> Raddi luego de 24 h de exposición a $19,6\pm 0,5$ mg/L de Pb^{2+}	75
17. Velocidad inicial de acumulación intracelular de Pb^{2+} en <i>Salvinia biloba</i> Raddi en función de la concentración inicial del metal en la solución.	76

RESUMEN

La fitorremediación es una tecnología ambientalmente pertinente que resulta muy útil como método alternativo a las tecnologías convencionales para el tratamiento de aguas residuales e industriales. Los sistemas basados en la utilización de plantas acuáticas han mostrado ser eficientes para eliminar una gran cantidad de contaminantes en diferentes tipos de aguas. Numerosos estudios han demostrado la capacidad de remoción de metales pesados por especies vegetales del género *Salvinia*. Sin embargo, es necesario generar más conocimiento sobre los mecanismos básicos involucrados en la biorremediación de metales en este género vegetal, con el fin de contribuir a la optimización en el desarrollo de fitotecnologías aplicadas al tratamiento de efluentes contaminados. El presente trabajo de investigación es una contribución al entendimiento de algunos factores y mecanismos participantes en la acumulación de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi. Para alcanzar estos objetivos, se evaluó la eliminación de Pb^{2+} en diferentes muestras de agua sintética contaminada artificialmente con distintas concentraciones iniciales (C_i) de Pb^{2+} ($4,8 \pm 0,3$; $9,1 \pm 0,4$ y $19,6 \pm 0,5$ mg/L), a diferentes tiempos de exposición (1/2, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h). A través de la realización de un análisis de compartimentalización se determinaron los valores para el factor de bioconcentración (FBC), el factor de adsorción (FAD) y el factor de acumulación intracelular (FAI), parámetros que permitieron caracterizar el proceso de eliminación de Pb^{2+} por esta planta. Se demostró que la biorremediación de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi se debe principalmente a un mecanismo de adsorción (valor de FAD en el intervalo de 857 a 1148), posiblemente relacionado con las características fisicoquímicas de su raíz. Además, se demostró que el Pb^{2+} se acumula intracelularmente en altas concentraciones (valor de FAI en el intervalo de 178 a 353) señalando la capacidad hiperacumuladora de *Salvinia biloba* Raddi para este metal. Finalmente, mediante la realización de estudios cinéticos se determinó que la eliminación de Pb^{2+} por esta macrófita acuática puede ser descrita a través de un modelo cinético de pseudo segundo orden, siendo la adsorción química (quimioadsorción) el mecanismo principal responsable de este fenómeno. Por su parte, la acumulación intracelular también contribuyó notablemente a la capacidad hiperacumuladora de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi, pudiendo aplicarse el modelo cinético de Michaelis-Menten para describir este proceso.

Palabras claves: *Salvinia biloba* Raddi, metales pesados, plomo, fitorremediación, hiperacumulación.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Metales

Un metal es todo aquel elemento químico caracterizado por ser buen conductor del calor y la electricidad, tener alta densidad y ser sólido a temperatura ambiente (excepto el galio y el mercurio). Sus sales forman iones electropositivos (cationes) en disolución y algunas otras forman aniones (oxianiones). De acuerdo a su densidad, los metales se clasifican en ultraligeros ($< 2 \text{ g.cm}^{-3}$), ligeros ($< 4,5 \text{ g.cm}^{-3}$) y pesados ($> 4,5 \text{ g.cm}^{-3}$). Del 90% de los elementos presentes en la corteza terrestre, el 80 % son metales y el 60 % son metales pesados (Sharma y Dietz, 2006). Los metales pesados se distinguen en al menos tres grupos: los metales tóxicos (mercurio, cromo, plomo, cinc, cobre, níquel, cadmio, cobalto, estaño), metales preciosos (paladio, platino, plata, oro, rutenio) y radionucleidos (uranio, torio, radio, americio) (Järup, 2003 y Wang y Chen, 2006).

En cuanto a su papel en los sistemas biológicos, los metales pesados se clasifican como esenciales y no esenciales. Los metales pesados esenciales son aquellos que son necesarios para la vida de los organismos en pequeñas cantidades debido a su participación en ciertas funciones fisiológicas. Algunos ejemplos de estos metales son el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cobre (Cu), el zinc (Zn) y el níquel (Ni) (Ali y col., 2013). Por ejemplo, en las plantas, el Fe ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) es un coadyuvante en la formación de la clorofila, además de participar en el mecanismo enzimático que opera en el sistema respiratorio celular y en las reacciones que involucran la división y el crecimiento celular. Asimismo, el Zn (Zn^{2+}) contribuye en la formación de las hormonas de crecimiento (auxinas), en la formación de la semilla y el grano, promueve la maduración y la síntesis de proteínas, y participa en la transformación y consumo de

carbohidratos (Jadia y Fulekar, 2009; Rascio y Navari-Izzo, 2011 y Ali y col., 2013). Aun cuando muchos de estos metales son esenciales para el crecimiento, se ha reportado que en exceso tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Volesky, 1999).

Los metales pesados no esenciales son aquellos que no cumplen un rol bioquímico y/o fisiológico y, por lo tanto, no son necesarios para el desarrollo de los organismos vivos. Algunos ejemplos de metales no esenciales son el cadmio (Cd), el plomo (Pb), el arsénico (As), el mercurio (Hg) y el cromo (Cr), que además son tóxicos para los seres vivos. Cuando las concentraciones de estos metales sobrepasan ciertos límites provocan efectos adversos en el crecimiento y/o en el desarrollo debido a que interfieren con el funcionamiento normal de los sistemas vivos (Ali y col., 2013).

1.1.1. Contaminación del ambiente por metales pesados

La contaminación ambiental por metales pesados se ha convertido en un serio problema. La movilización de metales pesados a través de la extracción de los minerales y el procesamiento posterior para diferentes aplicaciones ha dado lugar a la liberación de estos elementos en el ambiente. El problema de la contaminación por metales pesados es cada vez más grave debido al aumento de la industrialización y a la perturbación de los ciclos biogeoquímicos naturales. A diferencia de las sustancias orgánicas, los metales pesados son muy estables y, por lo tanto, se acumulan en el ambiente. Al no ser química ni biológicamente degradables, una vez liberados al ambiente pueden permanecer indefinidamente. La acumulación de metales pesados en los suelos y en las aguas supone un riesgo para el ambiente y para la salud humana (Cañizares, 2000). Estos metales provocan diferentes efectos

toxicológicos sobre los microorganismos presentes en los suelos conduciendo a una disminución tanto en su número como en su actividad celular (Khan y col., 2010; Ali y col., 2013; Abbas y col., 2014 y Dixit y col., 2015). Además, debido a la facilidad con la que los metales pesados son movilizados a través de los sistemas acuáticos naturales y a su elevada toxicidad para las formas superiores de vida, estos elementos se acumulan en los tejidos del cuerpo de los organismos vivos y sus concentraciones aumentan a medida que pasan de los niveles tróficos inferiores a los superiores (un fenómeno conocido como biomagnificación).

A pesar de que los efectos adversos que producen los metales pesados son ampliamente conocidos y difundidos, la exposición a estos continúa; incluso en algunas partes del mundo sigue aumentando, en particular, en los países menos desarrollados (Järup, 2003). La actividad antropogénica y la industrialización han acentuado la presión sobre el medio ambiente debido al aumento en la generación de grandes volúmenes de efluentes acuáticos que contienen metales pesados, metaloides, radionucleidos, así como diversos contaminantes orgánicos. Los efectos perjudiciales sobre los ecosistemas y los riesgos a la salud asociados con la liberación de contaminantes orgánicos e inorgánicos han sido bien establecidos por lo que es absolutamente necesario la continua aplicación de más y mejores estrategias de detección y tratamiento de los contaminantes ambientales (Fomina y Gadd, 2014).

1.1.2. Vías de entrada de los metales pesados en los sistemas acuáticos

Los metales pesados poseen tres vías principales de entrada en el medio acuático (Figura 1):

- a. La vía atmosférica, debido a la sedimentación de partículas emitidas a la atmósfera por procesos naturales o antropogénicos (principalmente combustión de combustibles fósiles y procesos de fundición de metales).
- b. La vía terrestre, principalmente a causa de filtraciones a las napas subterráneas o como consecuencia de la escorrentía superficial de terrenos contaminados.
- c. La vía directa, por medio del vertido directo de aguas residuales industriales y urbanas a los cauces fluviales.

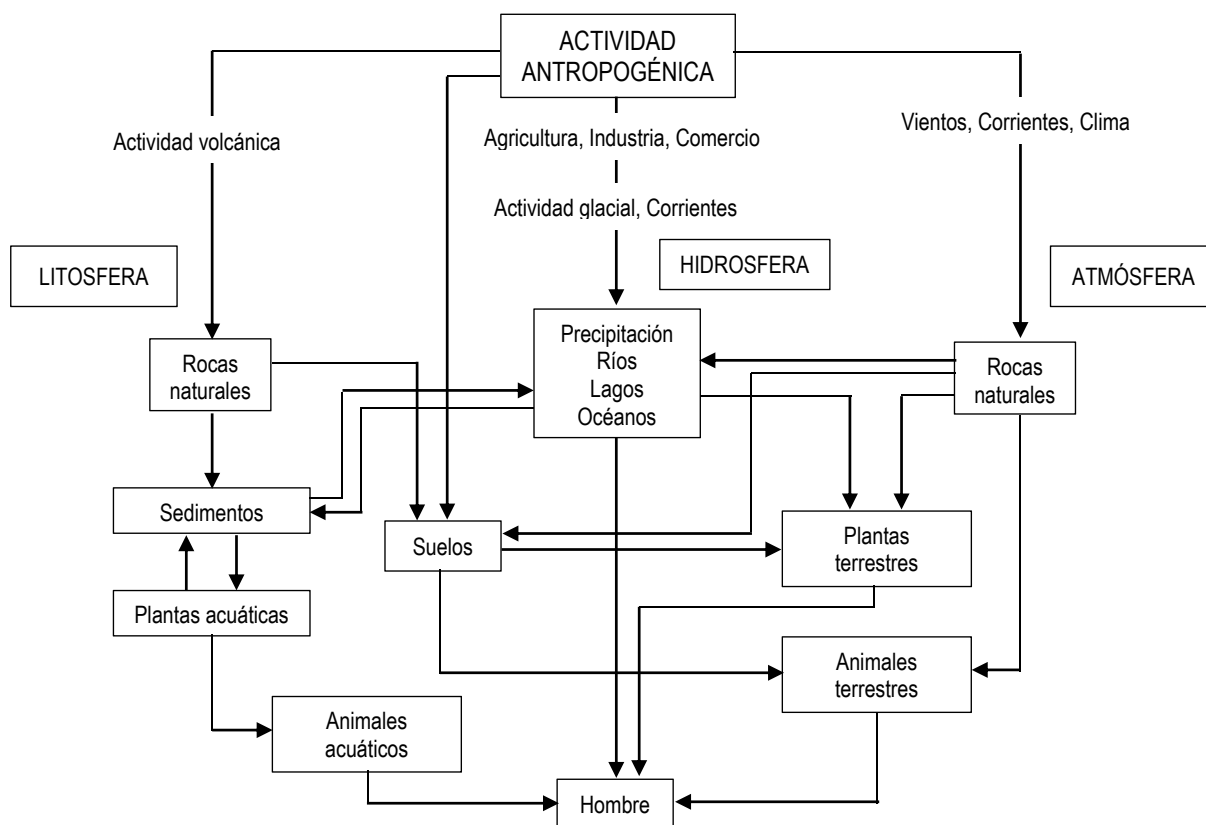


Figura 1. Ciclo biogeoquímico general de los metales pesados (Dionisio, 2012).

En los sistemas acuáticos continentales (ríos, lagos, embalses, etc.) los metales pesados son introducidos principalmente como resultado de la acción de procesos naturales y antropogénicos (Rosas, 2001 y Dionisio, 2012).

1.1.3. Efectos tóxicos de los metales pesados en la salud humana

Muchos metales pesados y metaloides son tóxicos para el ser humano y pueden causar efectos no deseados y graves problemas a la salud, incluso en concentraciones muy bajas. Los metales pesados causan estrés oxidativo en las células eucariotas. El estrés oxidativo se refiere a una mayor generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que puede doblegar las defensas antioxidantes intrínsecas de las células provocando daño celular o incluso su muerte (apoptosis). En cuanto a los efectos negativos sobre la salud de las personas, se ha reconocido que los metales más tóxicos son Hg, Cd, Pb, As, Cu, Zn, Sn y Cr. De estos, Hg, Cd, Pb y As son no esenciales, mientras que Cu y Zn son metales pesados esenciales (oligoelementos). Los metales tóxicos pueden causar diferentes problemas a la salud dependiendo de su estado de oxidación y de su concentración (Ali y col., 2013). La Tabla 1 resume los efectos nocivos de algunos metales sobre la salud:

Tabla 1. Efectos nocivos de algunos metales en la salud humana

Metal pesado	Límite de regulación EPA (ppm)*	Efectos nocivos	Referencia bibliográfica
Ag	0,100	La exposición a altos niveles de plata (Ag) por un período prolongado puede producir argiria, una condición caracterizada por el cambio de coloración de la piel y otros órganos y tejidos de su color natural a un azul-grisáceo. Las exposiciones a niveles menores también pueden producir depósitos de Ag en la piel y en otras partes del cuerpo.	ATSDR, 1990

Metal pesado	Límite de regulación EPA (ppm)*	Efectos nocivos	Referencia bibliográfica
As	0,010	La exposición al arsénico (As) puede causar irritación del estómago y los intestinos, daño de los vasos sanguíneos, alteraciones de la piel y del sistema nervioso. La exposición prolongada en niños ha demostrado alteraciones negativas en el coeficiente intelectual (IQ). El As (como arseniato) es un análogo del fosfato y, por lo tanto, puede interferir con los procesos celulares esenciales, tales como la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP.	ATSDR, 2007a y Tripathi y col., 2007
Ba	2,00	La exposición breve a altos niveles de bario (Ba) puede causar perturbaciones gastrointestinales y debilidad muscular. La ingestión de cantidades muy altas de compuestos de Ba solubles puede alterar el ritmo cardíaco, producir parálisis y posiblemente la muerte.	ATSDR, 2007b
Cd	0,005	La ingesta de cadmio (Cd) puede dañar gravemente los pulmones, produce irritación del estómago causando vómitos y diarrea. Además es carcinogénico, mutagénico, teratogénico y disruptor endocrino; interfiere con la regulación del calcio en los sistemas biológicos; provoca insuficiencia renal crónica y anemia.	ATSDR, 2012a; Salem y col., 2000 y Awofolu, 2005
Cr	0,100	Niveles altos de cromo (VI) puede producir irritación del revestimiento interno de la nariz provocando úlceras nasales, abundante secreción nasal y problemas respiratorios tales como asma, tos, falta de aliento o jadeo. También provoca la pérdida de cabello.	ATSDR, 2012b y Salem y col., 2000
Cu	1,300	La exposición al cobre (Cu) puede irritar la nariz, la boca, los ojos y causar dolores de cabeza, mareo, náuseas y diarrea. La ingestión puede producir daño hepático y renal, irritación intestinal y estomacal. La exposición a altos niveles de Cu puede causar daño cerebral, cirrosis hepática, anemia crónica, y en algunas ocasiones alcanzar la muerte.	ATSDR, 2004; Salem y col., 2000 y Wuana y Okieimen, 2011
Hg	2,000	La exposición a altas concentraciones de mercurio (Hg) produce daño permanente del cerebro. Los vapores de mercurio pueden afectar diferentes áreas del cerebro y las funciones asociadas con éstas. Algunas síntomas asociados con la intoxicación con Hg son: ansiedad, desarrollo de enfermedades autoinmunes, depresión, dificultad con el equilibrio, somnolencia, fatiga, pérdida de cabello, insomnio, irritabilidad, pérdida de memoria, infecciones recurrentes, alteraciones de la visión, temblores, úlceras y daños al cerebro, los riñones y los pulmones.	ATSDR, 1999; Neustadt y Pieczenik, 2007; Ainza y col., 2010 y Gulati y col., 2010
Ni	0,100	El efecto adverso más común de la intoxicación con níquel (Ni) es una reacción alérgica. La exposición a niveles muy altos produce bronquitis crónica y alteraciones en los pulmones, dolores de estómago y alteraciones en la sangre y en los riñones. La inhalación puede causar cáncer en los pulmones, nariz y senos paranasales; también se le ha atribuido a su inhalación la factibilidad de desarrollar cáncer de garganta y de estómago. Se ha demostrado que el Ni posee efecto hematotóxico, inmunotóxico, neurotóxico, genotóxico, tóxico-reproductivo, tóxico-pulmonar, nefrotóxicos y hepatotóxicos. Además, también ha sido reportado que causa pérdida de cabello.	ATSDR, 2005a; Salem y col., 2000; Khan y col., 2007; Das y col., 2008; Duda-Chodak y Baszczyk, 2008 y Mishra y col., 2010
Pb	0,015	La exposición a plomo (Pb) puede producir debilidad, especialmente en los dedos, las muñecas y los tobillos; asimismo provoca un pequeño aumento de la presión sanguínea, especialmente en personas de edad mediana y avanzada, pudiendo ocasionar anemia. La exposición a niveles altos de Pb puede dañar seriamente al cerebro y a los riñones, y en algunos casos ocasionar la muerte. La intoxicación con Pb afecta seriamente al sistema nervioso, especialmente en los niños, provocando alteraciones en el desarrollo cognitivo, reducción del coeficiente intelectual, pérdida de la memoria a corto plazo, problemas de	ATSDR, 2007c; Salem y col., 2000; Padmavathiamma y Li, 2007; Wuana y Okieimen, 2011 y Iqbal, 2012

Metal pesado	Límite de regulación EPA (ppm)*	Efectos nocivos	Referencia bibliográfica
		aprendizaje y de coordinación. También causa insuficiencia renal aguda y predispone a un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.	
Se	0,05	El selenio (Se) es necesario en bajas dosis para mantener una buena salud. La exposición breve a altas concentraciones de Se puede producir náuseas, vómitos y diarrea. La exposición crónica a altas concentraciones de compuestos de selenio puede producir una enfermedad llamada selenosis.	ATSDR, 2003
Zn	5	Los efectos nocivos se manifiestan a niveles de entre 10 a 15 veces superiores que los necesarios para mantener una buena salud. La ingestión de grandes cantidades de zinc (Zn) por breves períodos de tiempo puede causar calambres estomacales, náuseas y vómitos. Si se ingiere en grandes cantidades durante un período más prolongado puede causar anemia.	ATSDR, 2005b y Hess y Schmid, 2002

*Límite máximo permisible para agua potable según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Disponible en: <http://www.epa.gov/your-drinking-water/table-regulated-drinking-water-contaminants>

1.1.4. Fuentes de metales pesados en el ambiente

Los metales pesados se encuentran de forma natural en el ambiente debido a los procesos pedogenéticos (*i.e.*, en la formación de los suelos) producto de la meteorización de los materiales parentales; y también a causa del aporte realizado por diferentes fuentes antropogénicas (Tabla 2) tales como la minería, fundición, galvanoplastia, el uso de pesticidas, la descarga de fertilizantes y la deposición atmosférica (Dixit y col., 2015; Ali y col., 2013).

Se estima que la emisión de algunos metales pesados a la atmósfera a partir de fuentes antropogénicas es de uno a tres órdenes de magnitud mayor que el aporte realizado por fuentes naturales (Dixit y col., 2015).

1.2. Plomo (Pb)

1.2.1. Estrés por plomo

El plomo (Pb) es un miembro del Grupo IV B de la tabla periódica de los elementos. Tiene dos estados de oxidación, Pb (II) y Pb (IV), que son estables, pero la química ambiental del elemento está dominada por el ion plumboso (Pb^{2+}). El Pb elemental es un metal denso de color azul grisáceo ($\delta = 11,3 \text{ g/cm}^3$) con un punto de fusión a $327 \text{ }^\circ\text{C}$ y de ebullición a $1744 \text{ }^\circ\text{C}$. Este bajo punto de fusión fue el que permitió fundirlo y trabajarlo en las sociedades primitivas. El metal es muy blando, por lo que fácilmente se puede cortar y moldear. Esta cualidad fue la responsable de que durante mucho tiempo el Pb haya sido utilizado sobre tejados o para la fabricación de cañerías. El Pb metálico es relativamente impermeable a la radiación ionizante, razón por la cual se lo utiliza como material aislante al trabajar con rayos X y radioisótopos.

Tabla 2. Fuentes antropogénicas de algunos metales pesados en el ambiente

Metal pesado	Fuente	Referencia bibliográfica
As	Pesticidas, preservantes de madera, biosólidos, extracción minera y fundición.	Thangavel y Subbhuraam, 2004 y Dixit y col., 2015
Cd	Pinturas, pigmentos, estabilizadores de plástico, galvanoplastia, incineración de plásticos que contienen Cd, fertilizantes fosfatados.	Salem y col., 2000; Pulford y Watson, 2003 y Dixit y col., 2015
Cr	Curtiembres, industrias siderúrgicas y cenizas.	Khan y col., 2007 y Dixit y col., 2015
Cu	Pesticidas, fertilizantes, biosólidos, extracción minera y fundición.	Khan y col., 2007 y Dixit y col., 2015

Metal pesado	Fuente	Referencia bibliográfica
Hg	Explotación minera de Au y Ag, combustión de carbón (centrales térmicas) y residuos médicos hospitalarios (termómetros, manómetros, amalgamas dentales, etc.).	Memon y col., 2001; Wuana y Okieimen, 2011; Rodrigues y col., 2012 y Dixit y col., 2015
Ni	Efluentes industriales, electrodomésticos de cocina, instrumentos quirúrgicos, aleaciones de acero, baterías de automóviles.	Tariq y col., 2006 y Dixit y col., 2015
Pb	Emisión aérea de la combustión de gasolina con Pb, fabricación de baterías, herbicidas e insecticidas.	Thangavel y Subbhuraam, 2004; Wuana y Okieimen, 2011 y Dixit y col., 2015

El Pb no es un elemento esencial para los seres vivos (plantas y animales). De hecho, es un metal tóxico bien conocido que afecta a los mamíferos provocando, en los seres humanos, variados síndromes clínicos asociados con su toxicidad. El Pb afecta al sistema nervioso central, produce una disminución en la producción de células sanguíneas, afecta el funcionamiento de los riñones y del sistema reproductivo, y altera la conducta. La intoxicación con Pb en humanos se denomina "saturnismo" y sus síntomas se manifiestan con la aparición de fatiga, dolores de cabeza, dolores musculares y de estómago, anorexia, estreñimiento y, en su fase más aguda, "cólicos del plomo", es decir, calambres abdominales intensos acompañados de náuseas, vómitos y aumento en la presión arterial. Se han reportado casos clínicos en niños que han estado en contacto con suelos contaminados con Pb o con partículas de polvo atmosférico donde se determinó fehacientemente la presencia de Pb en su sangre (ATSDR, 2007c; Salem y col., 2000; Padmavathiamma y Li, 2007; Wuana y Okieimen, 2011 y Iqbal, 2012).

La contaminación ambiental por Pb se debe originariamente a la extracción de minerales del suelo que contienen trazas de este metal. El agua de percolación, lixiviación o escorrentía, es decir, propia del ciclo hidrológico, transporta Pb en pequeñas partículas provenientes de las

minas. Otras actividades antropogénicas hacen que predomine en las zonas rurales, urbanas e industriales (García, 2006 y Ali y col., 2013).

Las principales fuentes de contaminación por Pb son (Verma y Dubey, 2003 y García, 2006):

- Deposición aérea a causa de la explotación minera
- Gases contaminantes urbanos (especialmente en partículas de combustible no quemado)
- Deposición de residuos sólidos urbanos
- Fundición de metales
- Efluentes de plantas de reciclaje de baterías industriales
- Chimeneas de fábricas
- Aditivos para pinturas y gasolina
- Uso de municiones militares
- Procesos de plateado y terminación de metales
- Uso de fertilizantes

Los mecanismos involucrados en la toxicidad del Pb incluyen: i) competencia con metales esenciales (especialmente calcio y zinc), ii) alteración del transporte de iones necesarios para el correcto funcionamiento celular, iii) generación de estrés oxidativo, iv) afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas cuya interacción es capaz de alterar la estructura y la función enzimática de estas biomoléculas (Flora y col., 2012).

El catión libre (Pb^{2+}) también suele ser la forma más fitotóxica. Los factores que afectan la disponibilidad y absorción de Pb en los vegetales son la composición del medio, la capacidad

de intercambio catiónico, la superficie de la raíz y los microorganismos asociados a esta, y la tasa de transpiración (García, 2006; Dhir, 2013a y Dixit y col., 2015).

El Pb está clasificado como un ácido de Lewis dado que es una sustancia que, sin contener hidrógeno, es capaz de aceptar un par electrónico mediante la formación de enlaces covalentes coordinados. Por lo tanto, este metal se encuentra presente en el suelo estrechamente ligado a la materia coloidal o precipitado, hecho que reduce la absorción de Pb por las raíces de las plantas (García, 2006).

Es interesante notar que las investigaciones sobre la fitotoxicidad del Pb se encuentran estrechamente relacionadas con el estudio de la capacidad de acumulación del metal en las especies vegetales y su posible transmisión hacia el hombre a través de la cadena trófica. Por tal motivo, las plantas son herramientas muy útiles para el estudio de los mecanismos de biosorción y transporte de Pb, con el objeto de seleccionar y/o desarrollar variedades tolerantes capaces de aumentar la acumulación de este metal en sus tejidos para fines fitosanitarios.

1.2.2. Normativa vigente

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), establece que el agua potable no contenga más de 15 $\mu\text{g/L}$ (15 ppb) de Pb (ATSDR, 2007c). En el Anexo II del decreto reglamentario 831/93 de la Ley Nacional Argentina N° 24.051 de "Residuos Peligrosos" se detallan los niveles de calidad sanitaria que deben cumplir las fuentes de agua con tratamiento convencional destinadas a consumo humano, en la cual se establece que el Pb no debe superar los 50 $\mu\text{g/L}$; mientras que en el Anexo VI de este mismo decreto se establecen los límites para los parámetros químicos que deben cumplir los barros destinados a relleno sanitario en donde se admite hasta 1 mg/L de Pb.

Por otro lado, de acuerdo al documento “Desarrollos de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondientes a Plomo” de la República Argentina, se establece una categorización de las fuentes de provisión de agua para consumo humano en función de las concentraciones de Pb. En este documento se menciona que, para aguas superficiales con tratamiento convencional, la concentración de Pb en una muestra de agua filtrada debe ser menor o igual a 29,3 $\mu\text{g/L}$ ($C_{\text{pb}} \leq 29,3 \mu\text{g/L}$). Asimismo, para aguas subterráneas, la calidad apropiada para consumo directo o para cuando el uso esté condicionado a la aplicación de una técnica de desinfección debe ser $C_{\text{pb}} \leq 11,7 \mu\text{g/L}$ (referida a una muestra de agua sin filtrar) (SRIN, 2005).

En el artículo N° 982 del Código Alimentario Argentino se establece para el agua potable de uso domiciliario un límite máximo de Pb de 50 $\mu\text{g/L}$ (CAA, 2004), en concordancia con el Anexo II del decreto 831/93 citado anteriormente.

En la Provincia de Santa Fe, la Resolución N° 1089/82 que reglamenta el control del vertido de líquidos residuales establece las condiciones a las que deberá ajustarse un efluente considerando, además del lugar donde es volcado (distancia a las instalaciones de toma), la capacidad de dilución del cuerpo de agua receptor (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones a las que debe ajustarse un efluente conteniendo Pb de acuerdo a la capacidad de dilución del cuerpo receptor.

Plomo (mg/L)	Dilución
< 0,10-0,20	100-360
< 0,10-0,30	361-1300
< 0,15-0,45	1301-5000

1.2.3. El plomo y el ambiente

Desde hace varios años, el cuidado del medio ambiente ha tomado una creciente importancia a nivel mundial. A partir de la “Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano”, desarrollada en Estocolmo en el año 1972, se han incorporado más controles a las industrias que generan contaminación. Sin embargo, el análisis de algunas estadísticas nacionales pone en evidencia la existencia de un déficit significativo en las actividades desarrolladas por pequeñas y medianas empresas (PyMEs) para el cuidado del medio ambiente (Tabla 4).

Tabla 4. Actividades desarrolladas en las empresas con el objetivo del cuidado del medio ambiente (1998-2001) (INDEC, 2003).

Actividades	PyMEs (%)	Grandes (%)
Realizó mejoras en la eficiencia del uso de agua, insumos y energía	34	79
Incorporó sistemas para el tratamiento de efluentes y residuos	26	83
Estableció el reciclado interno o externo	23	69
Reemplazó o modificó procesos contaminantes	17	40
Sustituyó insumos o materias primas contaminantes	15	40
Implementó acciones de remediación del medio ambiente	15	30
Desarrolló productos más amigables con el medio ambiente	9	32
Alcanzó alguna certificación de gestión ambiental	5	32

En la “Cumbre Mundial sobre Desarrollo Sustentable de Johannesburgo”, en el año 2002, los países de la región manifestaron a través de la presentación de la “Iniciativa

Latinoamericana para el Desarrollo Sustentable” la necesidad de incorporar en las industrias el concepto de producción limpia, es decir, la aplicación sistemática de una estrategia ambiental preventiva integradora, aplicada a los procesos, productos y servicios, de modo de aumentar la eficiencia global de la empresa y reducir los riesgos para la salud humana y para el medio ambiente. Sin embargo, en la actualidad se presentan diferentes obstáculos para la implementación de procesos y conductas amigables con el medio ambiente de acuerdo al tipo de empresa (Tabla 5).

Tabla 5. Principales obstáculos encontrados en las empresas para emprender acciones en materia de protección del ambiente (1998-2001) (INDEC, 2003).

Obstáculos	PyMEs (%)	Grandes (%)
Alto costo de las tecnologías disponibles	39	54
Falta de información sobre las nuevas tecnologías disponibles	9	5
Inexistencia de dichas tecnologías en el mercado local	7	21
Falta de adecuación de las tecnologías disponibles a las necesidades de la firma o empresa	7	11

Al analizar estos datos queda en evidencia que para muchas empresas, más aún las PyMEs, existe una faltante de tecnologías accesibles que les permita reducir los niveles de contaminación. Por este motivo, el desarrollo de un sistema de tratamiento de efluentes que sea económico, de fácil aplicación, efectivo y duradero, facilitaría (y en algunos casos permitiría) que muchas industrias puedan acceder a tratar sus desechos, motivando de esta manera a un mayor compromiso con el medio ambiente.

1.3. Fitorremediación

La fitorremediación se refiere a la utilización de plantas vasculares para eliminar, parcial o completamente, sustancias contaminantes presentes en los suelos, lodos, sedimentos, aguas residuales y aguas subterráneas. La degradación de algunos de estos compuestos puede verse acelerada mediante la acción de ciertos microorganismos. Esta tecnología puede ser utilizada para la eliminación de diversos compuestos tales como radionucleidos, contaminantes orgánicos e inorgánicos (Pilon-Smits, 2005; Ali y col., 2013 y Dixit y col., 2015). La fitorremediación es impulsada por la energía solar, basándose en una serie de características fisicoquímicas de las plantas que ayudan en la rehabilitación de sitios contaminados. Durante los últimos años, se ha puesto un especial énfasis en la fitorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados (Robinson y col., 1997; Ali y col., 2013 y Dixit y col., 2015) ya que este tipo de tecnologías de tratamiento ha demostrado ser rentable, eficiente y amigable con el medio ambiente. La fitorremediación incluye diferentes fenómenos tales como fitoextracción (fitoacumulación o fitoabsorción), fitofiltración (rizofiltración), fitoestabilización (fitoinmovilización), fitovolatilización, fitodegradación (fitotransformación) y rizodegradación (fitoestimulación) (Ali y col., 2013; Dhir, 2013a; Gaur y col., 2014; Sharma y Pandey, 2014; Cameselle y col., 2013 y Favas y col., 2014). Un resumen de los diversos procesos implicados en la fitorremediación de metales pesados se muestra en la Figura 2.

La captación de los contaminantes por las plantas se ve afectada por varios factores, siendo los más importantes:

- **Especie vegetal:** las características físicas de las plantas juegan un papel relevante en la captación/eliminación de los contaminantes. Las adaptaciones genéticas y los

procesos biológicos propios de cada especie vegetal, que incluye su metabolismo y la capacidad de sus sistemas de transporte, influyen en la captación y absorción selectiva de nutrientes o contaminantes presentes en la matriz de crecimiento (suelo o agua). Las especies con alta tasa de producción de biomasa y con una elevada capacidad de adaptación a las condiciones climáticas son aquellas que presentan una mejor capacidad fitorremediadora. Las distintas asociaciones que se dan entre las plantas y los microorganismos de la rizósfera ayudan en el proceso de degradación/detoxificación/transformación de los contaminantes. Por otro lado, la selección de las especies de plantas, ya sean anuales o perennes, monocultivo o caducifolio, también es de una consideración importante. Finalmente, es fundamental que las plantas se adapten al clima del sitio en donde se pretende establecer el proceso de fitorremediación. Por lo tanto, la selección de las variedades vegetales es crítica para asegurar que la remediación sea eficaz. Para la remediación de metales se sugiere la identificación y selección de especies vegetales con capacidad para hiperacumular estos compuestos (Tangahu y col., 2011 y Dhir, 2013a).

- **Propiedades del medio:** los parámetros fisicoquímicos del medio, tales como el pH, la cantidad de materia orgánica, el potencial redox, la actividad de agua y el contenido de minerales, afectan directamente a la capacidad de eliminación/degradación del contaminante (Tangahu y col., 2011 y Dhir, 2013a).
- **Zona radicular:** la longitud y el diámetro de la raíz afectan la absorción y la degradación de los contaminantes. Esta degradación se ve facilitada por algunas enzimas vegetales y otros compuestos presentes en los exudados de la raíz. Las

raíces de las plantas liberan ácidos orgánicos, tales como el ácido cítrico y el ácido oxálico, que afectan la biodisponibilidad de los metales. El tipo, la cantidad y la actividad de las enzimas producidas por una planta y de los compuestos presentes en los exudados de la raíz varían entre las especies, e incluso dentro de las variedades o subespecies de una misma planta (Tangahu y col., 2011 y Dhir, 2013a).

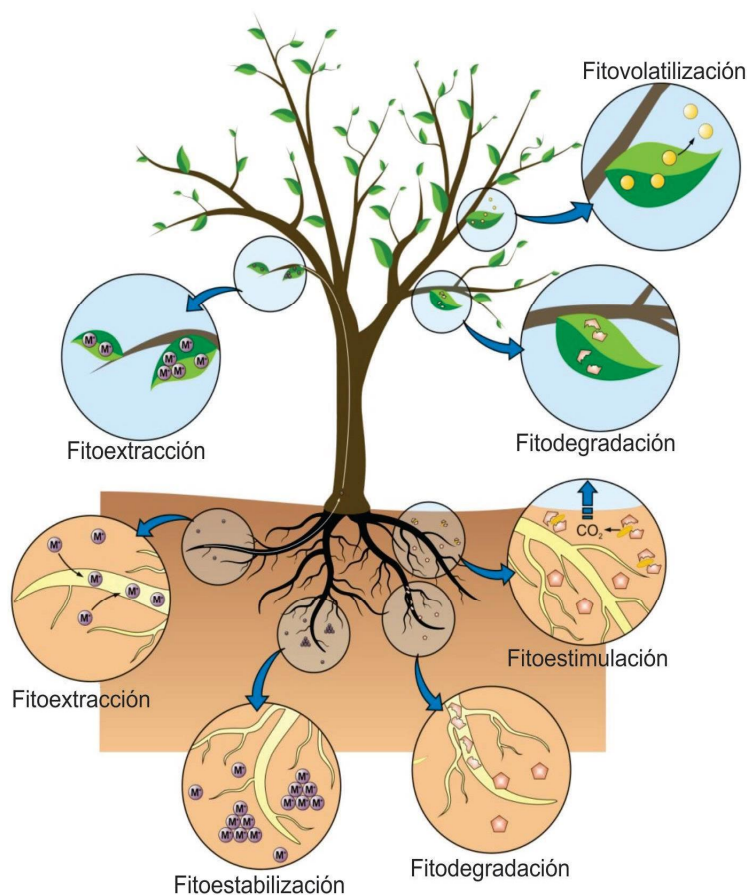


Figura 2. Diferentes procesos involucrados en la fitorremediación (Favas y col., 2014).

- **Agentes quelantes:** el aumento de la absorción de algunos contaminantes por las plantas puede ser influenciado por la presencia de agentes quelantes. Por ejemplo, la presencia de un ligando afecta a la bioasimilación de metales pesados a través de la formación de complejos metal-ligando. En la fitorremediación quelato-asistida se añaden compuestos sintéticos tales como el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) para mejorar la biodisponibilidad de los metales favoreciendo una rápida absorción, lo cual se traduce en períodos de remediación más cortos. La exposición de las plantas al EDTA podría mejorar la translocación de metal en el tejido vegetal, así como el rendimiento global de la fitoextracción. Sin embargo, el uso de quelantes sintéticos puede aumentar el riesgo de lixiviación. Por lo tanto, considerando que la biodisponibilidad de los metales pesados en los suelos disminuye por encima de valores de pH comprendidos entre 5,5-6,0, el uso de un agente quelante sólo se justificaría, o sería estrictamente necesario, en aquellos casos en donde se presentan suelos muy alcalinos (Tangahu y col., 2011 y Dhir; 2013a).

1.3.1. Fitodegradación

La fitodegradación o fitotransformación consiste en explotar la capacidad de las plantas que poseen enzimas especializadas (deshalogenasas, reductasas y oxigenasas) o cofactores (flavonoides) que favorecen la degradación de algunos contaminantes presentes en suelos y aguas subterráneas. Este método se limita principalmente a los contaminantes de tipo orgánico debido a su carácter biodegradable. Algunas propiedades de la sustancia orgánica a eliminar, tales como su solubilidad, polaridad, hidrofobicidad y coeficiente de partición (K_d), interfieren directamente con la entrada del contaminante a la planta (Delgadillo y col., 2011; Ali y col., 2013;

Dhir, 2013a; Gaur y col., 2014; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014). Para la eliminación de metales pesados se han desarrollado plantas genéticamente modificadas, como por ejemplo, álamos transgénicos (Ali y col., 2013 y Gaur y col., 2014).

1.3.2. Fitoestabilización

La fitoestabilización o fitoinmovilización es un proceso que implica la adsorción y precipitación de contaminantes, por efecto de las plantas, afectando su movilización. Este proceso tiene como objetivo la estabilización del contaminante en el sitio afectado en lugar de su eliminación, evitando su movimiento a través de las aguas subterráneas o a causa del viento (Prasad y Freitas, 2003; Carpena y Bernal., 2007; Delgadillo y col., 2011; Ali y col., 2013; Gaur y col., 2014; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014). Algunos ejemplos de plantas cultivadas con este propósito son los géneros: *Haumaniastrum*, *Eragrostis*, *Ascolepis*, *Gladiolus* y *Alyssum* (Favas y col., 2014).

1.3.3. Fitovolatilización

Este proceso utiliza plantas para captar contaminantes, tanto del suelo como de las aguas, seguido de la degradación posterior en formas menos tóxicas que luego son liberadas al ambiente mediante la transpiración vegetal. Las plantas pueden volatilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos (Prasad y Freitas, 2003; Delgadillo y col., 2011; Ali y col., 2013; Gaur y col., 2014; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014). Algunos ejemplos de plantas utilizadas en procesos de fitovolatilización son especies de *Astragalus bisulcatus* y *Stanleya pinnata* (Pilon-Smits y LeDuc, 2009 y Favas y col., 2014).

1.3.4. Fitoextracción

Este fenómeno también se conoce como fitoacumulación o fitoabsorción, y consiste en la absorción y captación de contaminantes por las raíces de las plantas, seguido de la translocación y la acumulación en las partes aéreas. Se aplica principalmente para la eliminación de metales pesados (Cd, Ni, Cu, Zn, Pb), pero también puede ser utilizado para otros elementos (Se, As) y compuestos orgánicos. Esta técnica utiliza preferentemente plantas hiperacumuladoras que tienen la capacidad de almacenar altas concentraciones de ciertos metales específicos en sus partes aéreas (0,01 % a 1 % en peso seco, dependiendo del metal) (Prasad y Freitas, 2003; Delgadillo y col., 2011; Zubillaga, 2012; Ali y col., 2013; Gaur y col., 2014; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014). Especies como *Splendens elsholtzia*, *Bertolonii alyssum*, *Caerulescens thlaspi* y *Pteris vittata* son ejemplos de plantas hiperacumuladoras para Cu, Ni, Zn/Cd y As, respectivamente (Van der Ent y col., 2013 y Favas y col., 2014).

1.3.5. Rizodegradación

La rizodegradación o fitoestimulación se refiere a la descomposición de los contaminantes orgánicos en el suelo a causa de los microorganismos presentes en la rizósfera (Ali y col., 2013; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014). La rizósfera se extiende hasta alrededor de 1 mm de la raíz y se encuentra influenciada por la planta (Pilon-Smits, 2005). La principal razón del aumento de la degradación de los contaminantes en la rizósfera es debido a la actividad metabólica de los microorganismos que la constituyen. Las plantas pueden estimular la actividad microbiana en la rizósfera entre 10-100 veces debido a la secreción de

exudados que contienen carbohidratos, aminoácidos y/o flavonoides. La liberación de estos compuestos proporciona fuentes de carbono y nitrógeno a los microorganismos del suelo y crean un ambiente rico en nutrientes en el que se estimula la actividad metabólica. Además de estos nutrientes, algunas plantas también liberan ciertas enzimas capaces de degradar contaminantes orgánicos presentes en los suelos (Pilon-Smits, 2005; Ali y col., 2013; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014).

1.3.6. Fitofiltración

La fitofiltración o rizofiltración consiste en la eliminación de contaminantes por las raíces de las plantas en aguas superficiales. Ello implica la adsorción, absorción o precipitación a través de las raíces de las plantas u otros órganos sumergidos, seguido por el secuestro en las raíces y demás órganos (Sánchez-Galván y Olgúin, 2009; Sánchez-Galván, 2010; Dhir, 2013a; Ali y col., 2013; Gaur y col., 2014; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014). Este proceso es aplicable para la eliminación de metales (Pb, Cd, Cu, Fe, Ni, Mn, Zn, Cr), el exceso de nutrientes y radionúclidos (^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{238}U , ^{236}U) presentes en aguas subterráneas, aguas superficiales y aguas residuales (Dushenkov y col., 1995,1997). La fitorremediación de los cuerpos de agua superficial contaminada se puede llevar a cabo *in-situ* o *ex-situ*. Los parámetros tales como el pH, velocidad de flujo y concentración de contaminantes pueden alterar la eficiencia de este proceso. La eliminación adecuada de la biomasa vegetal contaminada podría ser una limitación (Dushenkov y col., 1995; Sánchez-Galván y Olgúin, 2009; Sánchez-Galván, 2010; Ali y col., 2013; Dhir, 2013a; Gaur y col., 2014; Sharma y Pandey, 2014 y Favas y col., 2014).

1.4. Sistemas basados en bioadsorbentes

La bioadsorción es una propiedad de los organismos, en forma viable o no, que permite eliminar sustancias por la unión pasiva o fisicoquímica de especies químicas a biopolímeros constituyentes de la superficie de un material biológico (Gaad, 2009 y Sánchez-Galván, 2010). La bioadsorción ha demostrado ser una tecnología prometedora para la eliminación de metales en muestras de aguas residuales provenientes de actividades industriales, agrícolas o mineras. Distintas macrófitas (plantas acuáticas) han sido utilizadas en forma no viable como bioadsorbentes de metales pesados, especialmente plantas acuáticas flotantes del género *Salvinia*, *Azolla*, *Eichhornia*, *Lemna* y *Pistia*. Una de las principales desventajas de emplear bioadsorbentes no viables consiste en la necesidad de una preparación previa de la biomasa tal como secado y tamizado, y en algunos casos, la modificación química de la misma para lograr una mayor capacidad de adsorción (Sánchez-Galván, 2010; Sánchez-Galván y Olguín, 2009 y Abbas, 2014).

No obstante, los sistemas de bioadsorción más convencionales y ampliamente difundidos son aquellos que utilizan plantas acuáticas viables. Éstos consisten de una o más lagunas poco profundas en las cuales las macrófitas flotan en la superficie (Figura 3). Múltiples especies de plantas acuáticas han sido estudiadas en su capacidad para eliminar contaminantes en aguas residuales, desde aquellas con escarpelas de hojas flotantes y raíces sumergidas bien desarrolladas (*Ipomoea aquatica*, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*), hasta aquellas de superficie diminuta que flotan con pocas o sin raíces (por ejemplo, especies del género *Lemna*, *Salvinia*, *Azolla*, entre otras) (Sánchez-Galván y Olguín, 2009).

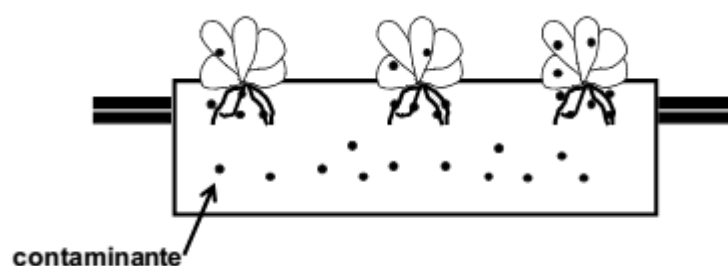


Figura 3. Esquema de un sistema de bioadsorción basado en lagunas con plantas acuáticas.

1.5. Mecanismos de acumulación y tolerancia a metales pesados en plantas

1.5.1. Acumulación e hiperacumulación

Para mantener la concentración de metales esenciales en límites fisiológicos y minimizar los efectos adversos de los metales no esenciales, las plantas han desarrollado una red compleja de mecanismos que les permiten mantener la homeostasis de los metales (Clemens, 2001).

La hiperacumulación de metales es una característica presente en más de 500 especies de plantas (Sarma, 2011; Van der Ent y col., 2013 y Pollard y col., 2014). Esta propiedad, combinada con su potencial de aplicación práctica y valor comercial, ha impulsado el estudio de las plantas hiperacumuladoras como modelo para la fitorremediación (Pollard y col., 2014). Estas plantas poseen una gama de mecanismos celulares implicados en la desintoxicación de metales pesados y, por tanto, en la tolerancia al estrés que estas sustancias les provocan. La hiperacumulación de metales y la tolerancia son rasgos que se heredan genéticamente. Recientemente, se han dado los primeros pasos en el entendimiento de las bases moleculares

implicadas en la hiperacumulación e hipertolerancia a metales en algunas especies de plantas (Maestri y col., 2010 y Sarma, 2011).

La hiperacumulación puede definirse como la capacidad de una planta para acumular altas concentraciones de metales y/o metaloides en sus tejidos (Baker y Whiting, 2002). Esta capacidad ha sido reportada para elementos como Pb^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , $Se^{4+,6+}$ y $As^{3+,5+}$, entre otros (Meharg, 2005). A su vez, Van der Ent y col. (2013), en una crítica reciente, han tratado de aclarar, modificar y actualizar la definición de plantas que tienen la capacidad de hiperacumular metales. En sus conclusiones, estos autores sostienen que un hiperacumulador puede definirse como una planta cuyas hojas contienen un elemento metálico a una concentración superior a un umbral especificado cuando crecen en la naturaleza (no en un cultivo experimental). Esta concentración umbral debe ser de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que la encontrada en las hojas de la mayoría de las especies que crecen en suelos normales y, por lo menos, de un orden de magnitud mayor que el rango usual encontrado en plantas que crecen satisfactoriamente en suelos metalíferos. En base a esto, las concentraciones mínimas nominales propuestas (en μg de metal por gramo de tejido de hoja seca) son: 100 para Cd, Se y Ti; 300 para Co, Cr y Cu; 1000 para As, Ni y Pb; 3000 para Zn y 10000 para Mn. Además de esta definición, las plantas hiperacumuladoras deben poseer una tolerancia al metal lo suficientemente elevada como para poder mantener una población autosustentable en suelos metalíferos (Pollard y col., 2014).

La acumulación de altas concentraciones de Al también ha sido reportada en varias especies vegetales (Metali y col., 2012), pero no está claro si la acumulación de los principales elementos del suelo es un fenómeno comparable a la hiperacumulación de oligoelementos (Van der Ent y col., 2013). En el caso de las plantas acuáticas, Zayed y col. (1998) propusieron dos criterios para definir a las especies como hiperacumuladoras de metales, siendo estos: a) una

concentración del metal en el tejido mayor que el 0,5 % del peso seco de la planta y, b) un factor de bioconcentración (FBC) mayor a 1000. Este factor se define como la relación entre la cantidad de metal encontrado en la biomasa (mg/Kg) y la concentración inicial del metal en el medio circundante (mg/L). De esta manera, un FBC de 1000 significa que el organismo es capaz de concentrar el producto hasta un valor mil veces superior al del ambiente.

1.5.2. Mecanismos de eliminación de contaminantes

El entendimiento de las estrategias fisiológicas y/o moleculares de defensa que adoptan las plantas hiperacumuladoras para lidiar con el estrés metálico, ya sea durante la acumulación, degradación o eliminación de estos contaminantes en suelos o aguas, son de suma importancia en los estudios de fitorremediación. Estos mecanismos son los que deciden, en gran medida, la eficiencia y el éxito de un sistema de biorremediación de metales basado en la utilización de plantas acumuladoras (Vangronsveld y col., 2009; Maestri y col., 2010 y Anjum y col., 2014). Procesos tales como exclusión, compartimentalización, formación de complejos y síntesis de proteínas de unión a iones metálicos son distintas estrategias de defensa que han sido evidenciadas en plantas bajo estrés metálico (Clemens, 2001; Mejáre y Bülow, 2001; Lee y col., 2005; Arrivault y col., 2006; Kanneganti y Gupta, 2008; Seth y col., 2012; Song y col., 2012; Lv y col., 2013 y Bolan y col., 2014). En particular, la quelación o formación de complejos es el mecanismo intracelular más extendido para el mantenimiento de concentraciones bajas de metales libres en el citoplasma de las plantas y para su desintoxicación. Este proceso se realiza, principalmente, mediante el empleo de compuestos que contienen grupos sulfhidrilo/tiol, tales como el tripéptido glutatión (GSH: γ -Glu-Cys-Gly) y proteínas de la familia de las fitoquelatinas (PC) y metalotioneínas (MT); y también por compuestos no-tioles tales como ácidos orgánicos y

aminoácidos (Clemens, 2001; Mejáre y Bülow, 2001; Seth y col., 2012; Lv y col., 2013 y Anjum y col., 2015) (Figura 4).

Las plantas acuáticas poseen mecanismos altamente específicos y eficientes para adquirir sustancias y micronutrientes esenciales del ambiente. La captación y eliminación de compuestos varía para cada categoría de macrófitas acuáticas, es decir, de flotación libre, sumergida o emergente. El modo de captación también es diferente de acuerdo a si el compuesto es de tipo orgánico o inorgánico. En el caso de los contaminantes de tipo inorgánico, como los metales pesados, la captación se ve facilitada por transportadores de membrana que actúan de manera activa o pasiva. El contaminante, una vez asimilado y absorbido, es transformado por una variedad de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de la planta y finalmente eliminado (Dhir, 2013b).

En la fitorremediación de contaminantes empleando plantas acuáticas de flotación libre (*Salvinia biloba*, *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes*, etc.) se pueden definir dos procesos (bioadsorción y bioacumulación):

- *Bioadsorción*: es un proceso rápido y reversible donde inicialmente ocurre la captación del contaminante por las raíces de la planta, desde donde luego es translocado a otras partes de la misma. En el caso de los iones metálicos, la bioadsorción se produce a través de las diferentes interacciones que ocurren con los grupos funcionales que se encuentran en las proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en la pared celular de las células vegetales (Dhir, 2013b).
- *Bioacumulación*: la bioacumulación (o acumulación intracelular) es un proceso lento e irreversible de secuestro del contaminante que resulta, finalmente, en su acumulación en las partes aéreas de la planta (Dhir, 2013b).

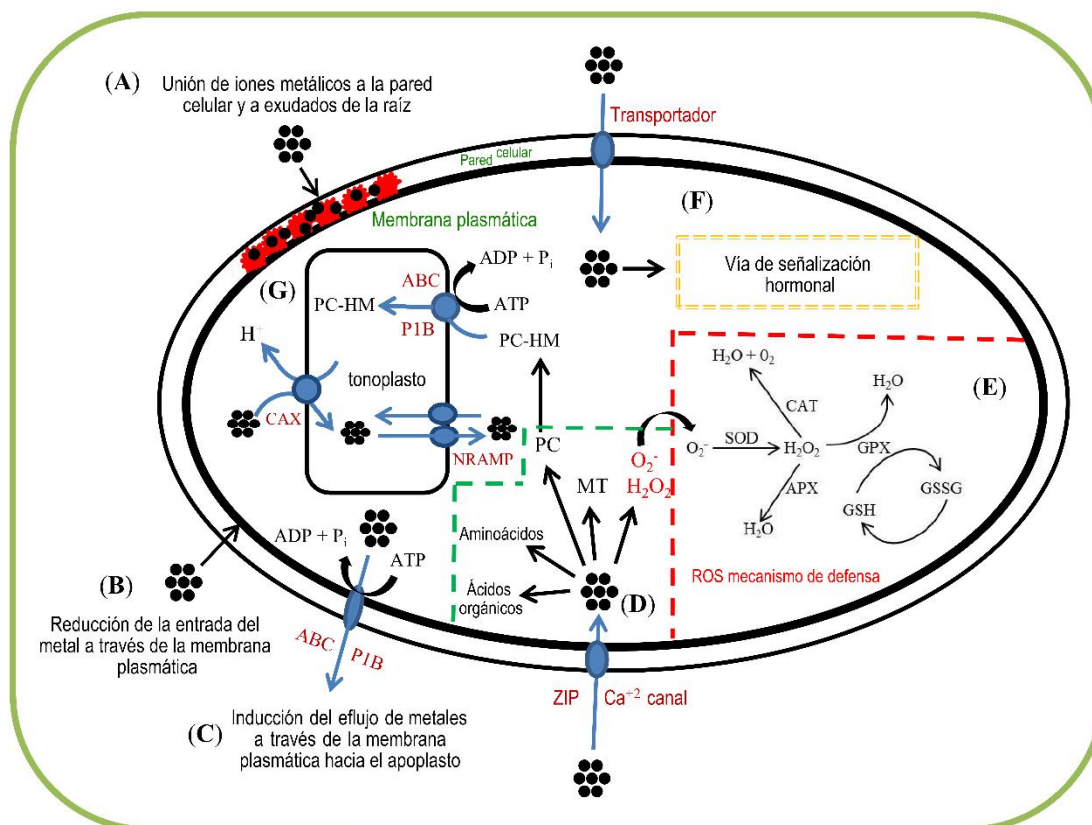
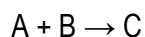


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes sistemas de defensa que utilizan las plantas expuestas a metales/metaloideos. Las respuestas de las plantas a los metales pesados incluyen: (A) unión de iones metálicos a la pared celular y a exudados de la raíz; (B) reducción de la entrada del metal a través de la membrana plasmática; (C) inducción del eflujo de metales a través de la membrana plasmática hacia el apoplasto mediante la estimulación de transportadores ATP-dependientes; (D) quelación de metales pesados (HM) en el citosol por ligandos tales como fitoquelatinas (PC), metalotioneínas (MT), ácidos orgánicos y aminoácidos; (E) inducción de sistemas de defensa antioxidantes (SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, APX: ascorbato peroxidasa, GPX: glutatión peroxidasa, GSH: glutatión reducido y GSSG: glutatión oxidado); (F) vía de señalización hormonal. Las hormonas vegetales (etileno, ácido jasmónico, ácido abscísico, etc.) están implicadas en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta, y desempeñan un papel crucial en la adaptación al estrés abiótico (por ejemplo, la presencia de metales); (G) compartimentalización en vacuolas intracelulares. Los iones metálicos se muestran como puntos negros (Anjum, 2015).

1.6. Cinética de la eliminación de contaminantes en una columna de agua

La cinética de una reacción juega un papel muy importante para la real aplicación de un proceso. A partir del estudio de la cinética de una reacción se pueden caracterizar las diferentes etapas por medio de las cuales los reactivos se convierten en productos.

Para una reacción general del tipo:



, la ley de velocidad de la reacción está dada por la siguiente ecuación:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k [A]^{\rho A} [B]^{\rho B}$$

, donde A y B representan los reactivos, C el producto, t es el tiempo en el cual se lleva a cabo la reacción, k es la constante de velocidad de la reacción y ρ es el orden de reacción respecto a cada uno de los reactivos, es decir, los órdenes parciales para A y B. La suma de los órdenes parciales da como resultado el orden total de la reacción, el cual permite comprender la dependencia de la misma con las concentraciones de los reactivos. Así, existen reacciones de orden cero, en las cuales la velocidad no depende de la concentración de los reactivos; reacciones de primer orden, cuya velocidad se relaciona de manera lineal con la concentración de uno de los reactivos; reacciones de segundo orden, en donde se pueden presentar dos casos: o bien la reacción tiene un único reactivo con una velocidad de reacción que depende del cuadrado de la concentración del mismo, o la reacción posee dos reactivos y la velocidad depende de manera lineal con cada reactivo; y así sucesivamente para órdenes superiores de

reacción. El orden se establece de manera empírica graficando la concentración del analito en función del tiempo y determinando matemáticamente la ecuación que mejor se ajusta a los datos experimentales.

En los estudios de biosorción generalmente se considera que el biosorbente está en exceso y, por tanto, lo que se determina es el orden de reacción respecto al contaminante. Cuando se llevan a cabo estudios de eliminación de contaminantes se encuentra que las cinéticas más comunes para estos procesos son de primer o segundo orden.

a. Modelo de cinética de primer orden:

$$-\frac{dC}{dt} = K_1 C \quad (1)$$

Esta expresión matemática se resuelve en su forma lineal integrada como:

$$\ln C = -tK_1 + \ln C_0 \quad (2)$$

Donde, C_0 y C son los valores de la concentración del contaminante (mg/L) en la columna de agua al tiempo cero y a tiempo t , respectivamente; K_1 es la constante de velocidad (h^{-1}) y t es el tiempo (h).

b. Modelo de cinética de segundo orden:

$$\frac{dC}{dt} = -K_2 C^2 \quad (3)$$

Esta expresión matemática se resuelve en su forma lineal integrada como:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + K_2 t \quad (4)$$

Donde, C_0 y C son los valores de la concentración del contaminante (mg/L) en la columna de agua a tiempo cero y a tiempo t , respectivamente; K_2 es la constante de velocidad (L/mg h) y t es el tiempo (h).

1.7. Modelos matemáticos de cinética de bioadsorción

Los modelos cinéticos resultan de gran utilidad para conocer los mecanismos de bioadsorción de diferentes sustancias o compuestos y las variables que influyen en la velocidad de los procesos. A partir de los datos experimentales se pueden evaluar y comparar los comportamientos de los bioadsorbentes para diferentes casos (Ofomaja y col., 2010).

Existen distintas etapas que pueden describirse en un proceso de bioadsorción:

- a. Transferencia de la sustancia o compuesto desde el seno de la solución hasta la película limitante que rodea al adsorbente. Esta película es la capa de líquido que rodea a cada partícula de biomasa y se considera prácticamente estanca, con poca o ninguna convección de líquido, de forma que el movimiento de la sustancia o compuesto se da por difusión simple.
- b. Difusión a través de la película limitante.
- c. Transferencia a través del líquido en el gel formado por la red hidratada de biopolímeros de la partícula adsorbente.

d. Fijación de la sustancia o compuesto sobre la biomasa

Para determinar cuál es la etapa que limita la velocidad de fijación del elemento o compuesto a la biomasa se pueden ajustar los valores experimentales a dos modelos cinéticos: el modelo cinético de pseudo primer orden y de pseudo segundo orden.

1.7.1. Modelo de pseudo primer orden

El modelo cinético de pseudo primer orden considera que la etapa limitante de la velocidad del proceso de bioadsorción es la transferencia de masa entre el seno de la solución y la película limitante que rodea a la biomasa (Ofomaja y col., 2010). Este modelo matemático fue desarrollado por Lagergren y se emplea con frecuencia para cuantificar la transferencia de masa entre dos fases. Normalmente se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{dq}{dt} = kA(q_e - q_t) \quad (5)$$

En la ecuación (5), q_e y q_t representan las cantidades de sustancia fijada a la biomasa en el equilibrio y al tiempo t , respectivamente. A indica el área interfacial, y k representa la constante de transferencia de masa en la película limitante. Si se considera que el área interfacial A permanece constante, puede definirse $k_1 = kA$; aplicando luego las condiciones de frontera ($q = 0$ a $t = 0$ y $q = q$ a $t = t$) e integrando, se obtiene:

$$\ln (q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (6)$$

Al analizar los datos experimentales, si estos se ajustan a la expresión de la ecuación (6), que representa una línea recta, entonces puede aplicarse este modelo cinético para explicar el fenómeno (Doran, 1998).

1.7.2. Modelo de pseudo segundo orden

El modelo cinético de pseudo segundo orden considera que el paso limitante de la velocidad del proceso de bioadsorción es la transferencia de masa a la superficie del bioadsorbente y no la difusión a través de la película limitante. La ecuación de velocidad de este modelo cinético se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{dq}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (7)$$

Donde k_2 es la constante de velocidad de segundo orden. Luego de separar las variables, aplicar las condiciones de frontera ($q = 0$ a $t = 0$ y $q = q$ a $t = t$) e integrar, se obtiene:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (8)$$

Además,

$$k_2 q_e^2 = h \quad (9)$$

A partir de la ecuación (8), se puede obtener la constante de velocidad de pseudo segundo orden graficando t/q_t vs t . Si los datos experimentales se ajustan a la ecuación lineal (8),

puede inferirse que la etapa limitante de la velocidad del proceso es la unión del elemento o compuesto a la superficie del bioadsorbente (Ho y McKay, 1998; Ho, 2006; Ofomaja, 2007; Ofomaja y col., 2010).

1.8. Modelos matemáticos de isothermas de adsorción

El proceso de bioadsorción tiene lugar hasta que se establece un equilibrio entre la cantidad de adsorbato fijado al sólido (q) y la porción que permanece en solución (C_e). Las isothermas de adsorción son modelos matemáticos que se utilizan ampliamente para describir datos experimentales y permiten determinar la capacidad de adsorción de un adsorbente por un adsorbato determinado. En consecuencia, son útiles para seleccionar el adsorbente más apropiado y predecir el rendimiento de los sistemas de adsorción. Para poder aplicar estos modelos matemáticos, es necesario poner en contacto al adsorbato con el adsorbente durante un período de tiempo determinado, procurando mantener el pH y la temperatura constantes durante todo el proceso. El tiempo óptimo se determina a través de la cinética del proceso. Este se define como el momento a partir del cual ya no se advierte variación de la concentración del adsorbato a lo largo del tiempo. Finalmente, se obtiene la isoterma de adsorción al graficar la cantidad de sustancia fijada q (generalmente expresada como mg adsorbato/g adsorbente) en función de la concentración que permanece en solución C_e (mg/L) (Volesky, 1996 y Ofomaja y col., 2010).

Las isothermas de adsorción de Langmuir y Freundlich son los dos modelos matemáticos más comúnmente empleados para describir los datos experimentales obtenidos a partir del estudio de diferentes sistemas de tratamiento de aguas contaminadas. A partir de estos análisis,

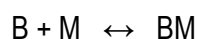
es posible obtener una ecuación que representa los resultados y que puede utilizarse con fines de diseño (Volesky, 1996; Villanueva, 2007 y Ofomaja y col., 2010).

1.8.1. Isotherma de Langmuir

Este modelo proporciona información acerca de la capacidad de adsorción de la biomasa (adsorbente) al adsorbato. Los supuestos en los que se basa en los siguientes:

- a. El número de sitios de adsorción en la biomasa es fijo.
- b. Los sitios de adsorción son independientes y uniformes.
- c. Sólo un tipo de adsorbato interacciona con los sitios de fijación formando una monocapa.
- d. Cada molécula de adsorbato reacciona con un sitio activo.
- e. No existe interacción entre las especies adsorbidas.

El modelo de adsorción de Langmuir considera que todos los sitios de unión en el adsorbente son sitios libres dispuestos a aceptar al adsorbato de la solución. Por lo tanto, la reacción de adsorción puede describirse como:



Donde B representa un sitio libre de unión, M representa el sorbato y BM el analito adsorbido sobre el sitio de unión B (Naja y col., 2010).

La forma clásica de la isoterma de Langmuir está representada por la siguiente ecuación:

$$q = \frac{q_{m\acute{a}x} b C_e}{1 + b C_e} \quad (10)$$

La cantidad de adsorbato fijado por unidad de masa de adsorbente (mg/g) está representada por el parámetro q , la máxima cantidad por $q_{m\acute{a}x}$, y b es el coeficiente de Langmuir (expresado en mg/L). Cada uno de estos parámetros posee un significado físico, siendo $q_{m\acute{a}x}$ el número total de sitios de fijación disponibles en el adsorbente; q , el número de sitios de fijación que se encuentran ocupados por el adsorbato a la concentración C_e , y b , un parámetro que se relaciona con la afinidad del adsorbato por el adsorbente. Un valor pequeño de b indica una alta afinidad. Adicionalmente, el valor numérico de b coincide con la concentración de adsorbato presente en el equilibrio cuando se han ocupado la mitad de los sitios de fijación del adsorbente (Schnoor, 1996; Volesky, 1996; Davis y col., 2003; Villanueva, 2007 y Volesky, 2007).

1.8.2. Isoterma de Freundlich

Es un modelo empírico basado en la adsorción sobre superficies heterogéneas donde los sitios de adsorción tienen distintas afinidades. Este modelo propone que en primer lugar se ocupan los sitios de alta afinidad y luego los de baja afinidad, sugiriendo la formación de una serie de capas en donde existen diferentes interacciones entre las moléculas adsorbidas. También asume la existencia de un número infinito de sitios de reacción desocupados. Al no considerar la saturación puede ser empleado razonablemente sólo a concentraciones de adsorbato (C_e) pequeñas.

La isoterma de Freundlich se expresa mediante la siguiente relación exponencial:

$$q = KC_e^{1/n} \quad (11)$$

Donde, K_F [(mg/g)(L/mg)^{1/n}] y n son las constantes de Freundlich relacionadas a la capacidad e intensidad de la adsorción, respectivamente. C_e es la concentración del metal en la fase líquida en el equilibrio (mg/L) (Schnoor, 1996; Volesky, 1996; Villanueva, 2007 y Volesky, 2007).

1.8. Cinética de acumulación intracelular

El modelo de Michaelis–Menten puede ser empleado para describir la cinética de acumulación intracelular de un contaminante en una determinada biomasa para un intervalo de concentraciones ensayadas (Lu y col., 2008). Este modelo cinético responde a la ecuación general (Abedin y col., 2002):

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [M]}{K_m + [M]} \quad (12)$$

Donde, V es la velocidad de acumulación intracelular del contaminante M a tiempo t (expresado como mg/g biomasa seca. h), $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de acumulación intracelular del contaminante (expresado como mg/g biomasa seca. h), K_m es la constante de Michaelis–Menten que representa la concentración del analito (mg/L) a la cual la velocidad de

acumulación intracelular es la mitad de la velocidad máxima, y $[M]$ es la concentración del contaminante en la solución (mg/L).

1.9. El género *Salvinia* y la captación de metales pesados

1.9.1. Generalidades del género *Salvinia*

Dentro de la familia Salviniaceae se reconocen alrededor de 10 especies de helechos acuáticos pertenecientes al género *Salvinia*, principalmente distribuidas en la región tropical del continente americano y en África. En América se encuentran 7 de las 10 especies, 4 de ellas en Argentina: *Salvinia minima* Baker, *Salvinia adnata* Desv. (también conocida como *Salvinia molesta* D.S. Mitch.), *Salvinia auriculata* Aubl. y *Salvinia biloba* Raddi (Martínez y Cacharani, 2011). Todas las especies de *Salvinia* se caracterizan por encontrarse en aguas dulces, ricas en nutrientes, preferentemente en zonas bajas; aunque en regiones tropicales y subtropicales es posible encontrarlas ocasionalmente por encima de los 1000 m.s.n.m. (Schneller, 1990 y Palacios y Rico, 1992).

Salvinia presenta tres formas de crecimiento. El crecimiento primario ocurre en plantas aisladas, siendo éste su estado más invasivo. Durante esta etapa de crecimiento presenta hojas pequeñas con forma ovalada, con un tamaño menor a 15 mm de ancho que permanecen tendidas en la superficie del agua. El crecimiento secundario ocurre cuando la planta ha permanecido en el agua durante un cierto período de tiempo y se caracteriza por la presencia de internodos más largos, con hojas en forma de canoa y ápices redondeados. En esta etapa, el tamaño de las hojas oscila entre 20 y 50 mm de ancho. El crecimiento terciario se presenta cuando la planta ha crecido tanto en número que forma un tapete estable, donde los

internodos se acortan y la hoja adquiere una forma de corazón alcanzando longitudes de hasta 60 mm de ancho (Mitchell y Tur, 1975 y Palacios y Rico, 1992).

1.9.2. Descripción botánica de *Salvinia biloba* Raddi

Salvinia biloba Raddi o “acordeón de agua” es una de las especies del género *Salvinia* que se encuentra más ampliamente distribuida en la República Argentina. Posee rizomas de 1,2-1,6 mm de diámetro, cuyo solenostela presenta forma de “U”. Sus láminas u hojas son de forma bilobada, plegadas, y sésiles o brevemente pecioladas, con lóbulos de 12-45 mm de largo x 6-30 mm de ancho. La cara adaxial (superior) se muestra papilosa con tricomas de 90-100 μm de longitud x 40-50 μm de ancho, unidos en el extremo, mientras que su cara inferior (envés) es pilosa con tricomas aciculares de 1-3 mm de longitud y venación anastomosada. Posee un órgano sumergido con un eje primario bien desarrollado, robusto, de 4-7 mm de largo x 1-2 mm de ancho, con 10-30 ejes secundarios pilosos, simples o ramificados, en plan dicótomo de 10-15 cm de longitud. Además, se observan 2 megaesporocarpos, globosos y apiculados, de 2 mm de longitud x 1,7 mm de ancho, con placenta poco ramificada, y un microesporocarpo ovoideo, apiculado de 2,5-3,0 mm de largo x 1,5 mm de ancho, con placenta dendrítica o dicotómicamente ramificada. Sus megaesporas poseen un tamaño de 300-400 μm diámetro y sus microsporas son más irregulares, tanto en forma como en tamaño, con un diámetro que varía ente 25-28 μm (Figura 5) (De La Sota, 1962; De La Sota, 1976; De La Sota, 1995 y Martínez y Cacharani, 2011).

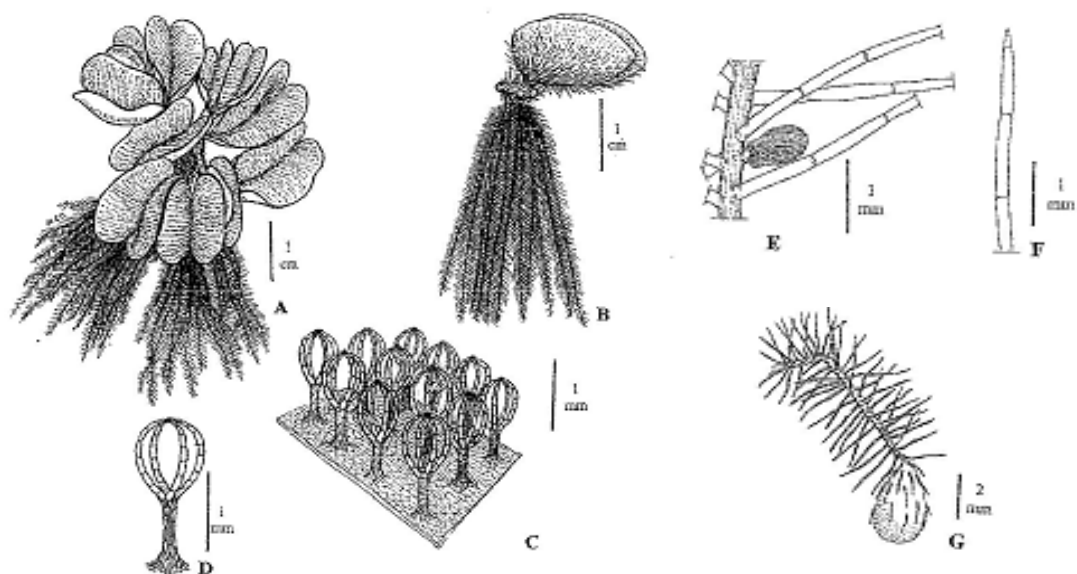


Figura 5. Representación esquemática de *Salvinia biloba* Raddi. A, aspecto de la planta; B, detalle de la planta mostrando el rizoma; C, papilas con tricomas; D, papila con tricomas unidos en el extremo; E, eje con tricomas aciculares y microesporocarpio; F, detalle tricomas aciculares; G, megasporocarpio en el extremo de eje (Martínez y Cacharani, 2011).

1.9.2.1. Clasificación taxonómica de *Salvinia biloba* Raddi (De La Sota, 1995)

Reino	:	Plantae
División	:	Pteridophyta
Clase	:	Polypodiopsida
Orden	:	Salviniales
Familia	:	Salviniaceae

Género	:	<i>Salvinia</i>
Especie	:	<i>biloba</i>
Nombre científico	:	<i>Salvinia biloba</i> Raddi
Sinonimia	:	<i>Salvinia herzoguii</i> De la Sota
Nombre común	:	Acordeón de agua

1.9.3. Acumulación de metales por especies del género *Salvinia*

Numerosos estudios han demostrado que el género *Salvinia* posee un excelente potencial para ser utilizado en el saneamiento de aguas contaminadas con compuestos inorgánicos y, en particular, con metales tóxicos. Srivastav y col. (1993), demostraron la capacidad de *Salvinia minima* para remover Pb^{2+} y Zn^{2+} en muestras de aguas contaminadas con concentraciones en el orden de 1 a 8 mg/L de estos metales pesados, observando una tasa de eliminación de entre un 70 a un 90% en sólo dos días. Por otro lado, Olguín y col. (2002) investigaron la capacidad de *Salvinia minima*, crecida en sistemas en lotes, para bioacumular Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr (VI) evaluando el efecto del pH y de la intensidad de la luz sobre este proceso. A partir de este estudio, los autores describieron por primera vez la capacidad hiperacumuladora de Cd^{2+} en *Salvinia minima* determinando un factor de bioconcentración (FBC) para este metal superior a 2000. Además, observaron un porcentaje de acumulación de Pb^{2+} en la biomasa de un 1,1%, mientras que la eliminación de Cr (VI) fue muy limitada. En un estudio posterior, Olguín y col. (2005) evaluaron el efecto de diferentes factores ambientales y de la presencia de nutrientes sobre los mecanismos de eliminación y la distribución de Pb^{2+} en diferentes compartimentos (biomasa, columna de agua y sedimentos) utilizando un sistema de lagunas en lote operadas con *Salvinia minima*. La adsorción a la superficie de la biomasa fue el mecanismo

de eliminación predominante en un medio en ausencia de EDTA y fosfatos. Bajo tales condiciones se obtuvieron valores de FBC>2000 y un contenido del metal en la biomasa de 2,7 %, demostrando que *Salvinia minima* también es hiperacumuladora de Pb^{2+} . Estos autores concluyeron que los mecanismos de eliminación de Pb^{2+} y su compartimentalización se encuentran principalmente influenciados por la presencia de ciertos nutrientes y ligandos, y dependen secundariamente de las condiciones ambientales. Además, estos resultados pusieron en evidencia que el porcentaje de eliminación de un determinado metal es un parámetro poco estimativo de la capacidad depuradora de un vegetal, y que la cuantificación del FBC mediante la realización de un análisis de compartimentalización es necesaria para acceder a un entendimiento más claro del proceso de eliminación de metales empleando plantas acuáticas (Olguín y col., 2005).

Sánchez-Galván y col. (2008) también se basaron en un análisis de compartimentalización para calcular el factor de adsorción (FAD) y el factor de acumulación intracelular (FAI) de Pb^{2+} en *Salvinia minima* con el objetivo de diferenciar y cuantificar los mecanismos involucrados en la hiperacumulación de metales pesados en esta especie acuática. Para realizar estos estudios, los autores expusieron plantas sanas a cinco concentraciones de Pb^{2+} en el rango de concentraciones comprendido entre $0,80\pm 0,10$ a $28,40\pm 0,22$ mg/L, utilizando sistemas en lote. Los resultados de estos estudios evidenciaron que la capacidad de *Salvinia minima* para eliminar Pb^{2+} en aguas contaminadas se debe principalmente a un fenómeno de adsorción (FAD=780-1980), probablemente debido a ciertas características fisicoquímicas de *Salvinia minima* tales como su elevada área superficial (264 m²/g) y el alto contenido de grupos carboxílicos de sus raíces ($0,95$ mmol H⁺/g peso seco). El uso de modelos cinéticos permitió predecir el tipo específico de mecanismo de captación del metal involucrado sugiriendo un fenómeno de quimioadsorción como el principal mecanismo

responsable de la acumulación de Pb^{2+} por *Salvinia minima*. Sorprendentemente, la capacidad de esta planta para acumular el metal en sus células (FAI=57-1007) no se mostró inhibida a causa de una potencial intoxicación, incluso a la concentración más elevada de Pb^{2+} analizada ($28,40 \pm 0,22$ mg/L).

Más recientemente, Casares y col., (2014) evaluaron la eficiencia en la eliminación de Cu^{2+} por *Salvinia minima* realizando un análisis de compartimentalización donde expusieron plantas a concentraciones crecientes del metal (entre 1 y 30 mg/L) durante un período de 6 días. Estos autores observaron que la concentración de Cu^{2+} en la biomasa sumergida fue de 3,9 a 6,5 veces superior a la encontrada en la biomasa aérea. Los resultados obtenidos a partir del análisis de compartimentalización pusieron en evidencia que la concentración de Cu^{2+} en la parte extracelular de la planta fue superior a la encontrada intracelularmente. Además, en el compartimento extracelular la acumulación de Cu^{2+} fue directamente proporcional a la concentración inicial del metal en la solución siguiendo un modelo lineal, mientras que en el compartimento intracelular los datos experimentales se ajustaron a una función polinómica. El FBC de Cu^{2+} calculado para *Salvinia minima* estuvo comprendido entre 351,7 y 578,5.

En otro estudio, también llevado a cabo muy recientemente, Fuentes y col. (2014) evaluaron la capacidad de *Salvinia minima* para captar y acumular Ni^{2+} . Nuevamente, esta especie vegetal demostró ser capaz de acumular grandes cantidades de este metal en sus tejidos, sobre todo en las raíces, sugiriendo que *Salvinia minima* podría también ser considerada como una especie hiperacumuladora de Ni^{2+} . A su vez, estos autores notaron dos fases durante la acumulación del metal, una primera etapa comprendida entre las primeras 6 a 12 horas, y una segunda etapa, más lenta que la anterior, que ocurrió hacia el final del experimento, el cual concluyó a las 144 h de exposición de la planta a 160 mM de Ni^{2+} . Si bien, *Salvinia minima* toleró concentraciones moderadas de Ni^{2+} , a concentraciones superiores a 80 mM su rendimiento

fisiológico se mostró altamente afectado. Por ejemplo, la integridad de las membranas celulares se vio seriamente alterada a medida que la concentración del metal y el tiempo de exposición aumentaron. Por otro lado, la acumulación intracelular de altas concentraciones de Ni^{2+} afectó también al proceso de fotosíntesis.

Maine y col. (2001) estudiaron la capacidad de *Salvinia herzogii* (*Salvinia biloba*) para acumular Cd^{2+} durante los meses más fríos del año (Junio, Julio y Agosto para el hemisferio Sur), enfrentando a esta planta a una concentración inicial del metal en la solución de 1 mg/L. Estos autores observaron una tasa de acumulación del 84% en un periodo de 21 días, demostrando que el mayor porcentaje de acumulación se dio durante las primeras 24 horas. En otro estudio similar, Maine y col. (2004) evaluaron la capacidad de *Salvinia herzogii* para eliminar Cr analizando la distribución del metal en la parte aérea (frondas) y en las raíces de la planta con respecto al tiempo de exposición. Los autores concluyeron que *Salvinia herzogii* tuvo un buen desempeño en la eliminación del metal y se adaptó al medio contaminado con concentraciones crecientes de Cr (III) en un rango comprendido entre 1 a 6 mg/L. En base a sus estudios, Maine y col. (2004) demostraron que el mecanismo de acumulación de Cr (III) en *Salvinia herzogii* implica dos etapas, una rápida y otra lenta. La captación del metal por adsorción a la raíz es el proceso más rápido completándose en las primeras 24 h, mientras que la etapa lenta comprende la translocación del metal al interior de la célula y, más tardíamente, hacia las hojas.

Paris y col. (2005) evaluaron la eficiencia de la adsorción de metales pesados por *Salvinia herzogii* y *Pistia stratiotes*. Para llevar adelante estos estudios, ambas especies vegetales se cultivaron conjuntamente en soluciones acuosas de Cr (III), Cd^{2+} o Pb^{2+} y en una mezcla conteniendo los tres metales (sistema mixto) en igual concentración (1 mg/L de cada metal). El proceso de absorción se produjo fundamentalmente durante las primeras 24 h. *Salvinia herzogii* presentó una mayor tasa de bioacumulación total (sumando los valores hallados

en raíces y en hojas) para los tres metales analizados. En ambas especies, se evidenció que el contenido de metales pesados en las raíces fue siempre superior al encontrado en las hojas. Notablemente, los metales combinados disminuyeron la tasa de crecimiento de las dos especies, debido probablemente a un efecto citotóxico sinérgico, pero sin afectar al proceso de absorción.

Suñe y col. (2007) estudiaron los procesos de bioacumulación de Cr (III) y Cd²⁺ en *Salvinia herzogii* y *Pistia stratiotes*. Estos autores demostraron que la eliminación de Cd²⁺ fue significativamente diferente para las dos especies vegetales, mientras que no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de Cr (III). Por otro lado, observaron que los procesos más importantes en la acumulación de Cd²⁺ en *Salvinia herzogii* fueron de tipo biológico, mientras que en *Pistia stratiotes* predominaron mecanismos fisicoquímicos como adsorción, quelación e intercambio iónico.

En base a lo expuesto, es evidente que el género *Salvinia* puede ser considerado como una herramienta muy útil para la fitorremediación de aguas contaminadas con metales. Por lo tanto, ahondar en los mecanismos y capacidades que ofrecen las distintas especies de esta planta acuática es de sumo interés para optimizar el desarrollo de fitotecnologías aplicadas a la biorremediación de cuerpos de aguas residuales, domésticas y/o industriales.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Estudiar los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de plomo (Pb^{2+}) en *Salvinia biloba* Raddi (acordeón de agua)

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para eliminar Pb^{2+} en muestras de aguas contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones iniciales de Pb^{2+} y a distintos tiempos de exposición.
- Determinar los parámetros FBC, FAD y FAI con el fin de evaluar la eficiencia en la eliminación del metal y la capacidad para hiperacumular Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi.
- Estudiar la cinética de la adsorción de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi
- Estudiar la cinética de acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección de plantas acuáticas

Las plantas acuáticas utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas en la zona del río Paraná Medio (litoral entrerriano-santafesino), específicamente en las coordenadas geográficas 32°52'37.03" S, 60°40'35.99" O (Figura 6), siendo identificadas inicialmente como pertenecientes al género *Salvinia* de acuerdo a su aspecto y características morfológicas (taxonomía). Las especies seleccionadas fueron trasladadas al laboratorio conservándose a temperatura ambiente en recipientes conteniendo agua de los humedales del cual fueron extraídas.

3.2. Caracterización taxonómica de la especie vegetal

La clasificación botánica de la especie se realizó mediante estudios taxonómicos llevados a cabo en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina). Los ejemplares remitidos al IBONE fueron examinados con las claves dicotómicas publicadas por De la Sota (1962; 1976 y 1995) resultando su clasificación como pertenecientes a la especie *Salvinia biloba* Raddi (Sinonimia: *Salvinia herzogii*). Estos especímenes fueron depositados en el herbario Carmen Cristóbal del IBONE para ser utilizados como ejemplares testigos para futuras investigaciones.

3.3. Cultivo de especies vegetales

Las plantas colectadas fueron lavadas con agua potable para eliminar cualquier residuo contaminante que pudiera interferir con el estudio (Torres y col., 2007). Luego, se sub-cultivaron en recipientes de vidrio y se mantuvieron en un espacio adecuado en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente y con adecuada intensidad lumínica artificial, operando en ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas. En estas condiciones, las plantas crecieron y se multiplicaron adecuadamente mostrando una buena capacidad de adaptación para el cultivo en invernadero. Periódicamente, se realizó el recambio del agua de los recipientes de cultivo evaluándose el estado de las plantas. En caso de que algún ejemplar presentase signos visibles de tejido dañado o deteriorado se procedió a su descarte, evitando su uso en ensayos posteriores (Sánchez-Galván y col., 2008).

3.4. Evaluación de la capacidad fitorremediadora

La capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para eliminar Pb^{2+} en muestras de agua sintética se estudió empleando diferentes unidades experimentales constituidas por recipientes de vidrio. A partir de una solución patrón (1000 mg/L) de $Pb(NO_3)_2$ (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) se realizaron diluciones adecuadas para obtener una concentración final de Pb^{2+} en cada recipiente correspondiente a $4,8 \pm 0,3$ (Tratamiento 1 = T_1), $9,1 \pm 0,4$ (Tratamiento 2 = T_2) y $19,6 \pm 0,5$ mg/L (Tratamiento 3 = T_3) en volúmenes finales de 1,5 L. Para cada uno de los tratamientos se instalaron 7 unidades experimentales de manera de establecer un sistema de trabajo en lotes, a los cuales se adicionaron 20,0 g de biomasa vegetal húmeda (previamente escurrida en un colador durante 5 min. y luego colocada sobre un papel de filtro a temperatura ambiente por

otros 15 min.). Se incluyeron dos tipos de controles: i) un recipiente conteniendo Pb^{2+} a la misma concentración inicial del tratamiento pero sin biomasa, que se utilizó para determinar la posible adsorción del metal a la superficie del recipiente y, ii) un segundo recipiente conteniendo biomasa pero sin la adición del metal. Éste último se utilizó para confirmar la ausencia de Pb^{2+} en la planta y en el medio.

Las condiciones del ensayo se mantuvieron constantes (concentración, volumen, temperatura de trabajo, etc.) para todos los grupos experimentales, conforme a lo establecido en los protocolos de trabajo para sistemas estacionarios operados en lotes (*batch*). En particular, se tuvo especial consideración respecto al valor de pH del medio, ya que la biosorción de metales pesados puede verse fuertemente inhibida a valores extremos. Para el caso particular del Pb^{2+} en solución acuosa, si el pH del medio alcanza valores cercanos a 8,0 o superiores, se produce una disminución en la solubilidad del mismo por precipitación de $Pb(OH)_2$ viéndose afectada la concentración analítica del metal. En el presente trabajo, el pH del medio se mantuvo en $6,5 \pm 0,2$ unidades, sin presentar cambios significativos durante el transcurso de los ensayos. En todos los ensayos, y para todos los grupos experimentales, la temperatura de trabajo se mantuvo constante (23 ± 2 °C).

Para avanzar en la determinación de los mecanismos involucrados en la fitorremediación de metales pesados se empleó el modelo de compartimentalización descrito por Olguín y col. (2005), en el cual se diferencian tres sitios en donde el metal puede ser encontrado: 1) en la columna de agua, 2) adsorbido a la superficie de la biomasa vegetal, 3) acumulado intracelularmente.

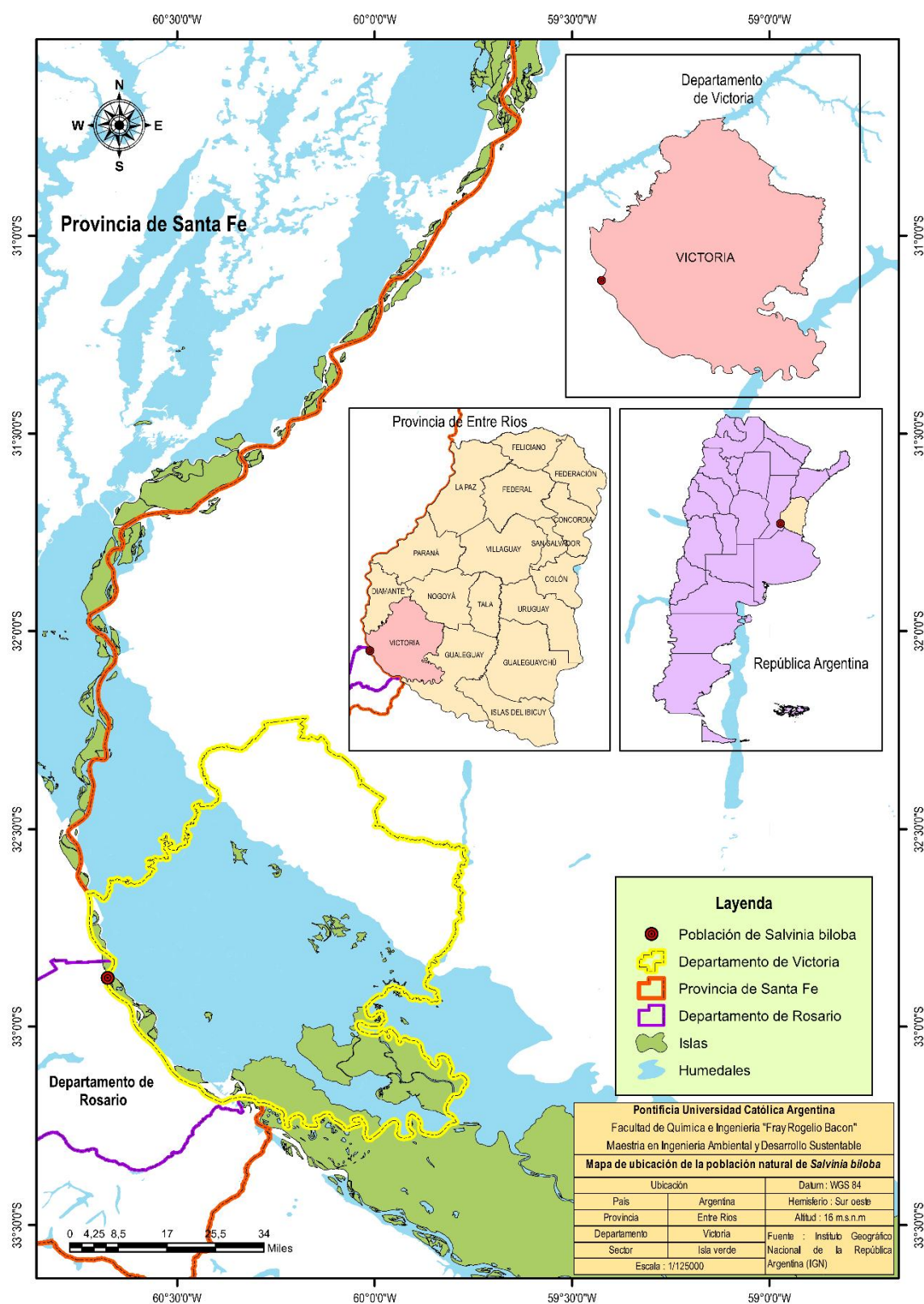


Figura 6. Mapa de la ubicación geográfica de la población natural de *Salvinia biloba* Raddi de la cual se recolectaron las muestras de biomasa vegetal utilizadas en el presente trabajo.

3.4.1. Cuantificación de Pb^{2+} en la columna de agua

El contenido de metal en la columna de agua se determinó a tiempo 0, 1/2, 2, 4, 6, 12 y 24 h por espectroscopia de absorción atómica empleando una llama de aire-acetileno, en un equipo Varian AA240FS (Varian Inc., Palo Alto, CA, EEUU) y según el procedimiento descrito en las normas APHA (1998). Antes de efectuar las mediciones de absorbancia de las muestras, se elaboró una curva de calibración midiendo la absorbancia a 207 nm de soluciones patrón de Pb^{2+} de concentración: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Para describir la variación en el contenido de Pb^{2+} en la columna de agua en función del tiempo se aplicaron modelos cinéticos de primer y segundo orden, y se evaluó estadísticamente el ajuste de cada modelo propuesto a los datos experimentales.

3.4.2. Cuantificación de Pb^{2+} adsorbido en la biomasa vegetal

El contenido de Pb^{2+} en la biomasa vegetal se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Olgún y col. (2005) con leves modificaciones. Brevemente, a cada tiempo de exposición se retiró la biomasa vegetal de su recipiente y se la dejó escurrir en un colador durante 5 min. Seguidamente, se dejó reposar durante 15 minutos en un papel de filtro para eliminar el exceso de agua. Posteriormente, se realizó un lavado con 400 mL de una solución de EDTA 1,7 mM durante 1 h con agitación orbital a 180 rpm con el objetivo de secuestrar por complejación el Pb^{2+} adsorbido superficialmente a las raíces de las plantas. Cabe aclarar que en este punto es particularmente importante mantener elevada la relación molar entre la concentración del agente complejante en el agua de lavado y el metal (relación molar EDTA/ Pb =12) para asegurar su total complejación. Finalmente, el contenido de Pb^{2+} en el agua

de lavado se cuantificó por espectroscopia de absorción atómica de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

3.4.3. Cuantificación de Pb²⁺ acumulado intracelularmente

La cantidad de Pb²⁺ acumulado intracelularmente se determinó sobre una porción de materia vegetal previamente secada en estufa a 90°C hasta peso constante. Una muestra de 0,05 g de biomasa seca triturada se dejó reposar durante 12 h con 10 mL de HNO₃ concentrado (Cicarelli, Santa Fe, Argentina). Posteriormente, la muestra se colocó en un bloque de digestión bajo una campana de extracción, y se calentó a una temperatura de 110°C durante 2 h hasta observar la desaparición de vapores pardos. Finalmente, el contenido de Pb²⁺ intracelular en las muestras digeridas se analizó espectrofotométricamente de manera análoga a la descrita anteriormente (Olguín y col. (2005). Adicionalmente, se determinó el porcentaje de humedad de cada muestra de biomasa a través de la determinación gravimétrica de la pérdida de agua por calentamiento a 90°C hasta peso constante. Este dato se utilizó para recalcular la concentración intracelular de Pb²⁺ expresada en mg/L (AOAC, 1990).

3.4.4. Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Pb²⁺

El factor de bioconcentración (FBC) se calculó de acuerdo a la ecuación propuesta por Zayed y col. (1998):

$$\text{FBC} = \frac{\text{Contenido de Pb}^{2+} \text{ en el tejido de la biomasa (mg/Kg biomasa seca)}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)}}$$

Los factores de adsorción (FAD) y acumulación intracelular (FAI) se calcularon empleando las ecuaciones definidas por Sánchez-Galván-Galván y col. (2008):

$$\text{FAD} = \frac{\text{Contenido de Pb}^{2+} \text{ adsorbido en la biomasa (mg/Kg biomasa seca)}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)}}$$

$$\text{FAI} = \frac{\text{Contenido de Pb}^{2+} \text{ acumulado intracelularmente (mg/Kg biomasa seca)}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)}}$$

Para avanzar en el entendimiento y caracterización físico-química de los diferentes mecanismos involucrados en la biosorción de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi se aplicaron los modelos cinéticos de pseudo-primer orden o modelo de Lagergren (Lazaridis y Asouhidou, 2003) y de pseudo-segundo orden (Ho y McKay, 1999).

El equilibrio de adsorción de Pb^{2+} a la biomasa se evaluó utilizando el modelo de Langmuir y el modelo de Freundlich (Chakraborty y col., 2014). Finalmente, el modelo de Michaelis-Menten (Abedin y col., 2002) se empleó para describir la acumulación intracelular de Pb^{2+} en las células vegetales.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron empleando el programa SPSS v. 23 mediante la aplicación de regresiones lineales y ajustes no lineales para la evaluación de los diferentes modelos empleados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Eliminación de Pb^{2+} en muestras de agua sintética utilizando *Salvinia biloba* Raddi

Se evaluó la capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para eliminar Pb^{2+} en muestras de agua contaminadas artificialmente, empleando un modelo de sistemas *in vitro* operados por lotes. Inicialmente, la capacidad fitorremediadora se determinó cuantificando la concentración del metal remanente en la columna de agua a distintos tiempos de exposición (Figura 7). La cinética no lineal de desaparición de Pb^{2+} observada para las tres concentraciones ensayadas sugiere que *Salvinia biloba* Raddi utiliza varios mecanismos para la remoción de este metal. Estudios previos en otras especies del género *Salvinia* han propuesto que la adsorción a la superficie de la raíz sería probablemente el componente más rápido involucrado en este mecanismo (Olguín y col., 2005; Sánchez-Galván y col., 2008; Sánchez-Galván, 2010). Esta unión se realiza a través de una combinación de procesos físicos y químicos tales como quelación, intercambio iónico y precipitación de los iones metálicos sobre la superficie de la raíz. Los procesos biológicos que involucran la captación intracelular del metal y su posterior translocación a las partes aéreas de la planta serían los pasos responsables de las etapas más lentas del proceso de fitorremediación (Maine y col., 2001).

Como puede observarse en la Tabla 6, el porcentaje de remoción del metal alcanzó el 80 % en las primeras 6 h de ensayo para la concentración más baja de Pb^{2+} utilizada ($4,8 \pm 0,3$ mg/L). Durante el mismo periodo de tiempo (6 h), pero utilizando C_i mayores de Pb^{2+} , los porcentajes de eliminación disminuyeron significativamente alcanzando valores de $71,7 \pm 10,7$ % y $60,5 \pm 8,4$ % para $9,1 \pm 0,4$ y $19,6 \pm 0,5$ mg/L de Pb^{2+} , respectivamente. Al final del ensayo (24 h), el Pb^{2+} fue casi completamente eliminado de la columna de agua, superando el 90 % de

remoción en todas las concentraciones ensayadas (Tabla 6). Asociado a estos resultados, se verificó la correlación altamente positiva ($R^2 > 0,9$) entre el porcentaje de eliminación de Pb^{2+} de la columna de agua y el tiempo de exposición; es decir, a medida que se incrementó el tiempo de exposición aumentó la tasa de eliminación del metal.

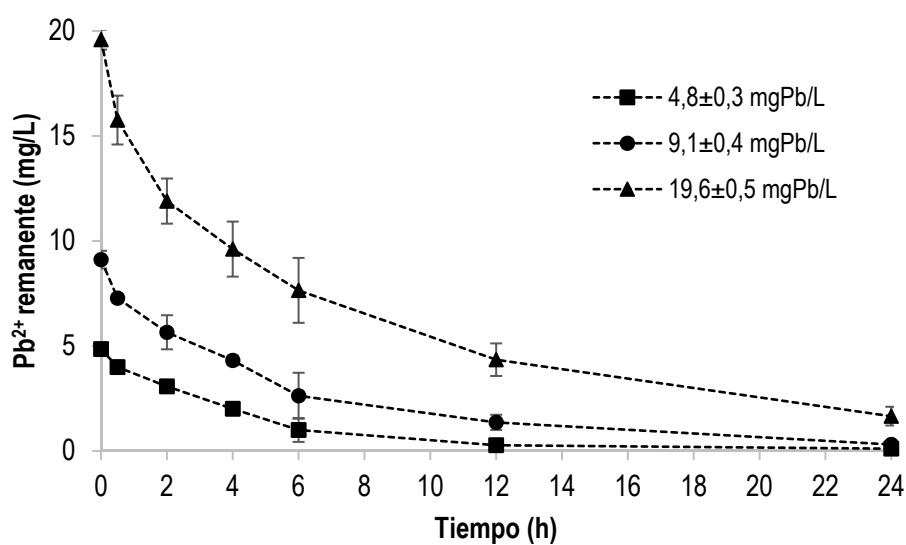


Figura 7. Curvas de eliminación de Pb^{2+} (mg/L) en la columna de agua en sistemas por lotes operados con *Salvinia biloba* Raddi. Los valores representan el promedio \pm SE ($n=2$).

A pesar de la alta eficiencia de remoción encontrada para las tres C_i de Pb^{2+} ensayadas, se pudo evidenciar una correlación negativa entre el porcentaje de eliminación y la C_i del metal ($R^2=0,989$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de eliminación a las 24 h para los tratamientos T_2 y T_3 (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua a distintos tiempos de exposición en sistemas en lotes operados con *Salvinia biloba* Raddi.

Tiempo de exposición (h)	4,8±0,3 mg/L (T ₁)	9,1±0,4 mg/L (T ₂)	19,6±0,5 mg/L (T ₃)
	Porcentaje ¹	Porcentaje ¹	Porcentaje ¹
0	0	0	0
0,5	17,7±0,3 ^a	20,1±1,4 ^a	19,7±4,0 ^a
2	36,8±1,4 ^b	38,3±6,1 ^{ab}	39,4±4,0 ^b
4	58,8±3,7 ^c	52,7±0,3 ^b	51,1±5,5 ^{bc}
6	80,0±10,5 ^d	71,7±10,7 ^c	61,1±7,0 ^c
12	94,5±3,3 ^{de}	84,9±4,6 ^{cd}	77,9±3,4 ^d
24	97,7±0,1 ^e	96,6±0,4 ^d	91,6±2,1 ^d

¹Los valores representan el promedio±SE. Las letras a-e, representan diferencias estadísticamente significativas entre los promedios evaluado mediante la prueba de Duncan ($P < 0,05$).

Nuestros resultados demuestran que la C_i del metal en la muestra de agua y el tiempo de exposición (T_e) afectan directamente a la eficiencia de eliminación de contaminantes en este tipo de sistemas naturales de tratamiento. La eliminación de Pb^{2+} empleando *Salvinia biloba* Raddi demostró ser un proceso lo suficientemente rápido como para alcanzar un estado de equilibrio entre las primeras 12 a 24 h de exposición. Cuando se desea controlar la operación de un sistema de tratamiento de efluentes que utiliza plantas acuáticas, es importante conocer el tiempo necesario para alcanzar cierto grado de remoción de un determinado contaminante. De esta manera, es posible adecuar la periodicidad de las descargas que impactan sobre el sistema, estableciendo un tiempo mínimo de reposo que le permita al mismo recuperar parte de su capacidad fitorremediadora.

A continuación, y con el objetivo de determinar la velocidad de eliminación de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi, se aplicaron diferentes modelos cinéticos para evaluar la relación existente entre el tiempo y la concentración de Pb^{2+} remanente en la columna de agua. Como se observa

en la Figura 8, nuestros resultados experimentales se ajustaron satisfactoriamente a un modelo de cinética de primer orden.

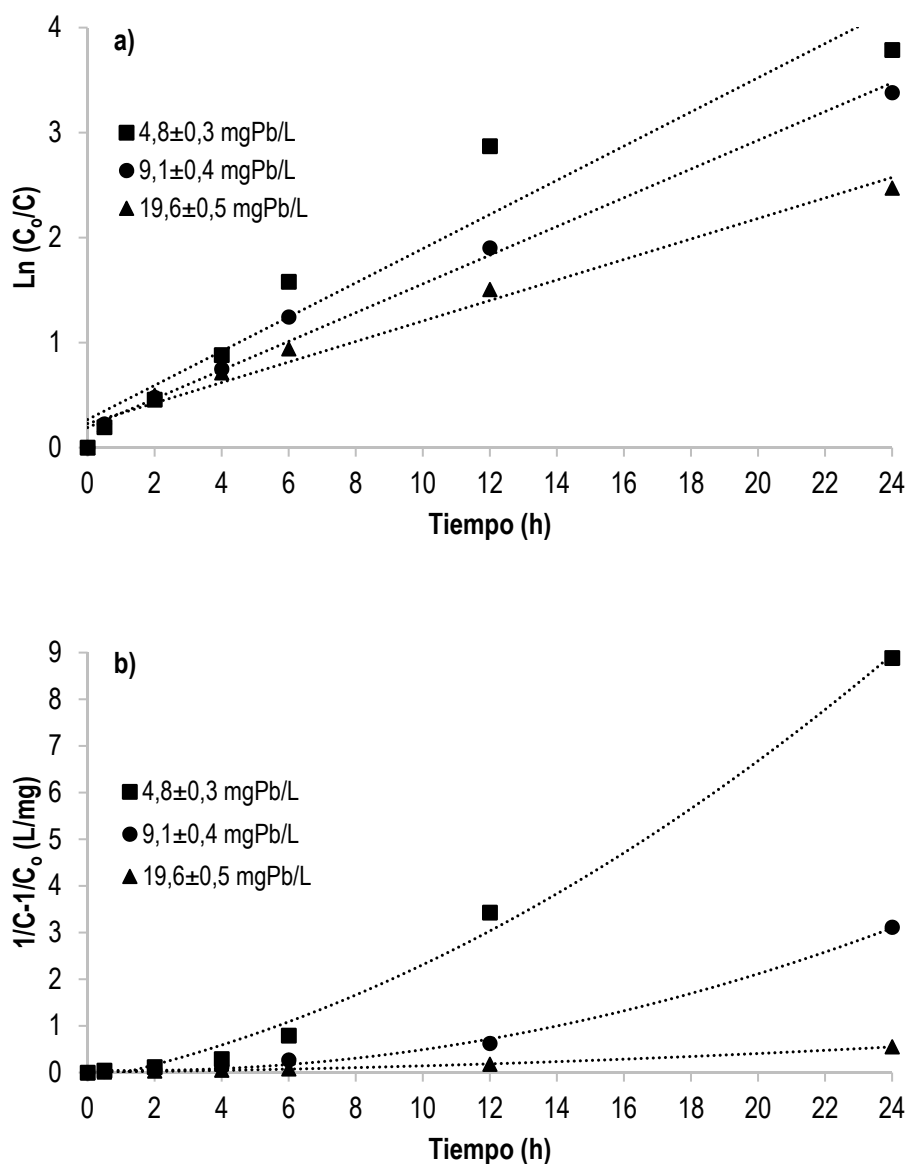


Figura 8. Cinéticas de eliminación de Pb^{2+} (mg/L) en columna de agua empleando *Salvinia biloba* Raddi. a) Cinética de primer orden; b) Cinética de segundo orden.

La constante de velocidad K_1 fue mayor ($0,163 \text{ h}^{-1}$) para la C_i de Pb^{2+} más baja ensayada ($4,8 \pm 0,3 \text{ mg/L}$), mientras que para $9,1 \pm 0,4 \text{ mg/L}$ y $19,6 \pm 0,5 \text{ mg/L}$ se reportaron valores menores ($0,137 \text{ h}^{-1}$ y $0,098 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Por lo tanto, la C_i del metal afectó negativamente a la constante de velocidad (Tabla 7), indicando que la eliminación de Pb^{2+} se hace cada vez más lenta a medida que aumenta la concentración del contaminante en el sistema.

Tabla 7. Cálculo de las constantes de velocidad de eliminación de Pb^{2+} (K) en lagunas operadas con *Salvinia biloba* Raddi empleando dos modelos cinéticos.

Tratamiento	C_i (mgPb ²⁺ /L)	Cinética de primer orden		Cinética de segundo orden	
		K_1 (1/h)	R ²	K_2 (L/mg.h)	R ²
T ₁	4,8±0,3	0,163	0,9358	0,379	0,9678
T ₂	9,1±0,4	0,137	0,9873	0,126	0,9077
T ₃	19,6±0,5	0,098	0,9751	0,022	0,9638

Estudios previos han reportado la eficiencia de *Salvinia biloba* para eliminar Cd^{2+} (84 % de remoción) en muestras de agua de lago contaminadas artificialmente empleando un modelo de estudio similar al utilizado en el presente trabajo (Maine y col., 2001). En otro estudio análogo, Maine y col. (2004) evaluaron la capacidad de *Salvinia biloba* para eliminar Cr (III), reportando una eficiencia de remoción de entre 70-83 %. En el presente trabajo, la eficiencia de eliminación para el Pb^{2+} alcanzó valores muy satisfactorios (>90%), empleando concentraciones del metal similares a las utilizadas en otros estudios para diferentes metales. Si bien, este es el primer trabajo que reporta la cinética de eliminación de Pb^{2+} en la especie *Salvinia biloba* Raddi, existen numerosos antecedentes para *Salvinia minima*. Sánchez-Galván (2010), reportó la capacidad de eliminación de Pb^{2+} en sistemas de lagunas en lote operadas con *Salvinia minima* para un periodo de 24 h, obteniendo una eficiencia de remoción del $96,67 \pm 1,99 \%$ para una C_i del metal

de $4,70 \pm 0,06$ mg/L, con una velocidad de eliminación de $0,1895 \pm 0,006$ mg/L.h. Estos valores son compatibles con los hallados en este estudio, donde a una C_i de Pb^{2+} igual a $4,8 \pm 0,3$ mg/L la eficiencia de remoción a las 24 h alcanzó el $97,7 \pm 0,1$ %, siendo la velocidad de eliminación de $0,195$ mg/L.h. En un estudio reciente, Leal y col. (2016) reportaron una capacidad de eliminación de Pb^{2+} por *Salvinia minima*, también para un periodo de 24 h, del 92 % para una C_i de Pb^{2+} de $8,2876$ mg/L (40 mM). Estos valores son congruentes con los hallados en este trabajo para *Salvinia biloba* Raddi empleando una C_i de $9,1 \pm 0,4$ mg/L de Pb^{2+} ($96,9 \pm 0,4$ % de eliminación).

En otras investigaciones realizadas con plantas acuáticas de libre flotación como las lemnáceas, bajo condiciones experimentales análogas, se han encontrado porcentajes de eliminación menores para el Pb^{2+} respecto a los informados en este trabajo. Hurd y Sternberg (2008) reportaron un porcentaje de eliminación de Pb^{2+} de 86%, en un periodo de 24 h, para un sistema en lote utilizando *Lemna minor* expuesta a una C_i del metal de 5 mg/L. En ese mismo trabajo, los autores informaron una velocidad de eliminación de $0,1791$ mg/L.h. En el presente trabajo, *Salvinia biloba* Raddi mostró un valor 11% superior ($97,7 \pm 0,1$ %) para una C_i de Pb^{2+} similar ($4,8 \pm 0,3$ mg/L) y con una velocidad de eliminación ligeramente mayor ($0,195$ mg/L.h). Meza y col. (2013), informaron una capacidad de eliminación de Pb^{2+} por *Pistia stratiotes* en muestras de agua desionizada enriquecida con Nitrofoska® Foliar del 81,3 % en un periodo de 15 días, para una C_i de 5 mg/L. Chen y col. (2015), en un estudio desarrollado empleando un sistema de lagunas operado con *Ceratophyllum demersum* en medio Hoagland, reportaron una capacidad de eliminación de Pb^{2+} del 26,3 % en un periodo de 14 días, para una C_i de $4,14$ mg/L (20 mM). Verma y Suthar (2015) reportaron una eficiencia del 97,2 % en la eliminación de Pb^{2+} en sistemas con *Lemna gibba* a un pH=7 y para una C_i de 5 mg/L, en un periodo de evaluación de 7 días.

Adicionalmente, Uysal y Taner (2009) reportaron una constante de velocidad de eliminación (K_1) de Pb^{2+} de $0,2912 \text{ h}^{-1}$, en un sistema con *Lemna minor*, a una temperatura de 25°C y para una C_i de 5 mg/L , mientras que en este estudio con *Salvinia biloba* Raddi, en condiciones similares, se obtuvo una constante de velocidad significativamente menor ($K_1=0,163 \text{ h}^{-1}$).

Finalmente, en relación al modelo cinético observado para la eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua empleando *Salvinia biloba* Raddi, se ha reportado que en sistemas de lagunas operadas con *Spirodela intermedia* la eliminación de Pb^{2+} del medio se ajusta satisfactoriamente ($R^2=0,930$) a un modelo de cinética de primer orden (Miretzky y col., 2004).

4.2. Análisis de compartimentalización

Una vez estudiada la eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua, se propuso evaluar la distribución del metal en *Salvinia biloba* Raddi a través de un análisis de compartimentalización (Olguín y col., 2005). Para ello, se definieron tres destinos o “compartimentos” donde encontrar al metal: 1) adsorbido a la superficie de la biomasa, 2) acumulado intracelularmente en la biomasa total (sin discernir entre raíz y parte aérea) y, 3) remanente en la columna de agua. Los resultados que se muestran en la Figura 9 claramente indican que, a partir de las 6 h, la mayor cantidad de Pb^{2+} se encuentra adsorbido extracelularmente a la superficie vegetal. Al final del período de exposición (24 h), el porcentaje de Pb^{2+} adsorbido superficialmente fue superior para la C_i más baja ensayada: $T_1 (87,4 \%) > T_2 (74,2 \%) > T_3 (66,9 \%)$; mientras que el Pb^{2+} acumulado intracelularmente siguió un esquema inverso: $T_3 (27,6 \%) > T_2 (16,4 \%) > T_1 (11,9 \%)$ (Figura 10). Estos resultados indican que la cantidad de Pb^{2+} adsorbido por *Salvinia biloba* Raddi parece estar afectada negativamente por la C_i del metal, sugiriendo una posible saturación de los sitios

activos presentes en la superficie de la raíz a medida que aumenta la concentración del metal en la solución. Por el contrario, el Pb^{2+} acumulado intracelularmente se ve afectado de manera directa por la C_i del metal, incrementándose a medida que se eleva la concentración del contaminante en la solución.

Resultados similares fueron obtenidos por Hurd y Sternberg (2008) quienes realizaron un balance de masa a las 24 h de exposición en un sistema análogo operado con *Lemna minor* empleando una C_i de Pb^{2+} de 5 mg/L. Estos autores reportaron que el porcentaje de Pb^{2+} adsorbido a la biomasa vegetal fue de 82,85 %; mientras que el Pb^{2+} remanente en la columna de agua y en los sedimentos alcanzó valores comprendidos entre un 5-6%. Adicionalmente, Sánchez-Galván y col. (2008) realizaron un análisis similar con *Salvinia minima* en agua desionizada contaminada con una C_i de Pb^{2+} de $4,70 \pm 0,06$ mg/L reportando valores del metal en la biomasa cercanos al 90 % y remanente en la columna de agua y en los sedimentos de 3 y 8 %, respectivamente. Por su parte, Olguín y col. (2005) hallaron porcentajes de Pb^{2+} adsorbido cercanos al 55 % en un sistema operado con *Salvinia minima* expuesta a una C_i de Pb^{2+} de $12,9 \pm 0,6$ mg/L en medio Hutner modificado (sin la adición de EDTA y fosfatos). Posteriormente, Sánchez-Galván y col. (2008) utilizando este mismo medio en sistemas con *Salvinia minima* expuesta durante 24 h a una C_i de Pb^{2+} de $15,18 \pm 0,55$ mg/L reportaron valores del metal adsorbido del orden del 52 %. En el presente trabajo, utilizando una cantidad de biomasa equivalente a la empleada por estos autores y C_i del metal similares, se hallaron porcentajes de Pb^{2+} adsorbido para *Salvinia biloba* Raddi superiores (74,2 % para $9,1 \pm 0,4$ mg/L y 66,9 % para $19,6 \pm 0,5$ mg/L). Esta diferencia podría atribuirse a la presencia del cloruro de calcio en el medio Hutner, ya que ha sido sugerido que el ion Ca^{2+} podría bloquear la unión de Pb^{2+} a la superficie radicular (Olguín y col., 2005).

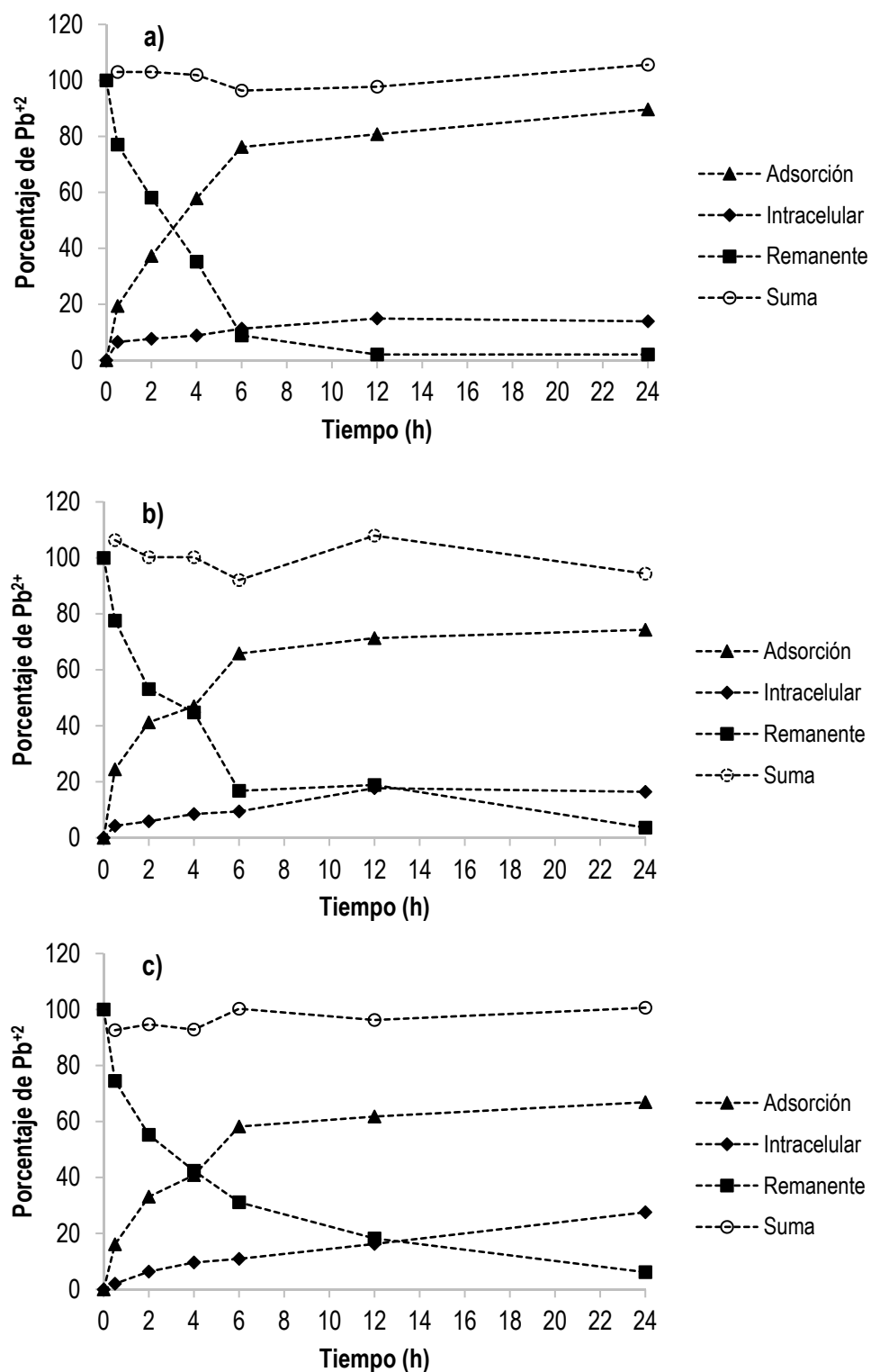


Figura 9. Análisis de compartimentalización de Pb^{2+} en sistemas en lagunas en lote operadas con *Salvinia biloba* Raddi. Las curvas muestran la distribución de Pb^{2+} en los tres compartimentos definidos (▲, adsorbido superficialmente; ◆, acumulado intracelularmente; ■, remanente en columna de agua) para las distintas C_i de Pb^{2+} ensayadas: a) $4,8 \pm 0,3$ mg/L; b) $9,1 \pm 0,4$ mg/L y c) $19,6 \pm 0,5$ mg/L.

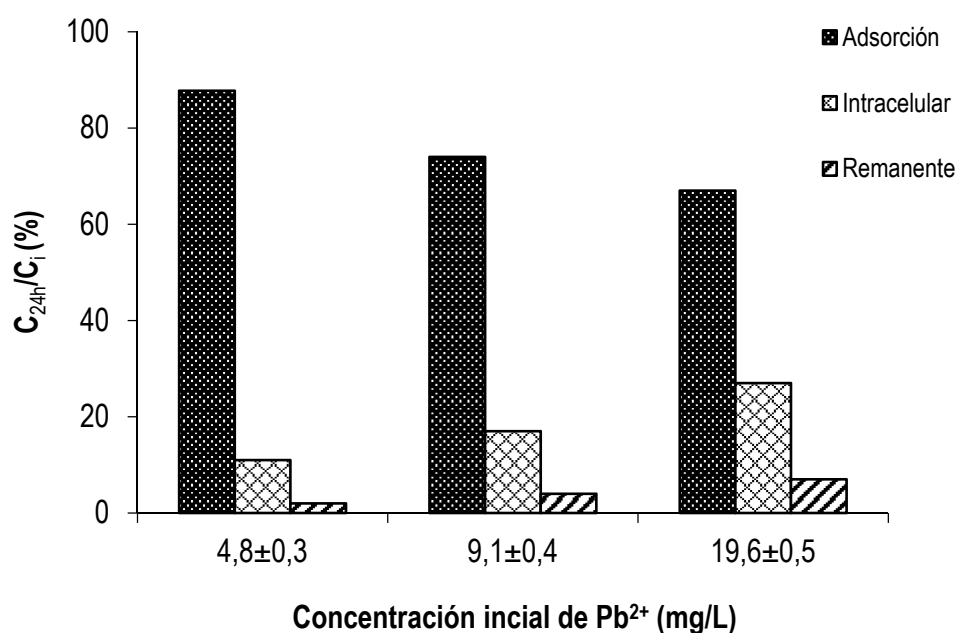


Figura 10. Distribución de Pb²⁺ en los tres compartimentos definidos al tiempo final (24 h) de exposición de *Salvinia biloba* Raddi a las distintas C_i del metal evaluadas.

Estudios relacionados han demostrado que los iones Ca²⁺ bloquean el transporte intracelular de Pb²⁺ en la raíz de *Oryza sativa* (Kim y col., 2002). A su vez, Antosiewicz (2005) observó que la toxicidad por Pb²⁺ en *Brassica juncea* disminuye a medida que el contenido de Ca²⁺ en el medio aumenta, sugiriendo la existencia de una competencia entre ambos cationes divalentes por su sitio de unión. Adicionalmente, se ha descrito que la presencia de Ca²⁺ disminuye la absorción de metales pesados a través de las raíces de diversas especies de plantas, reduciendo de este modo la toxicidad del metal (Seregin y Kozhevnikova, 2009).

4.3. Evaluación del factor de bioconcentración (FBC), factor de adsorción (FAD) y factor de acumulación intracelular (FAI)

El factor de bioconcentración (FBC) ha sido ampliamente utilizado para evaluar la capacidad de acumulación de contaminantes en diversos organismos, desde microorganismos hasta vertebrados, incluyendo las plantas acuáticas (Kahle y Zauke, 2003; Fayiga y col., 2004; Burton y col., 2006 y Fuentes y col., 2014). Zayed y col. (1998) propusieron, por primera vez, establecer un valor para el FBC superior a 1000 para definir a una especie vegetal como hiperacumuladora de metales. Este valor indica que el organismo es capaz de concentrar el producto hasta un valor mil veces superior al del ambiente.

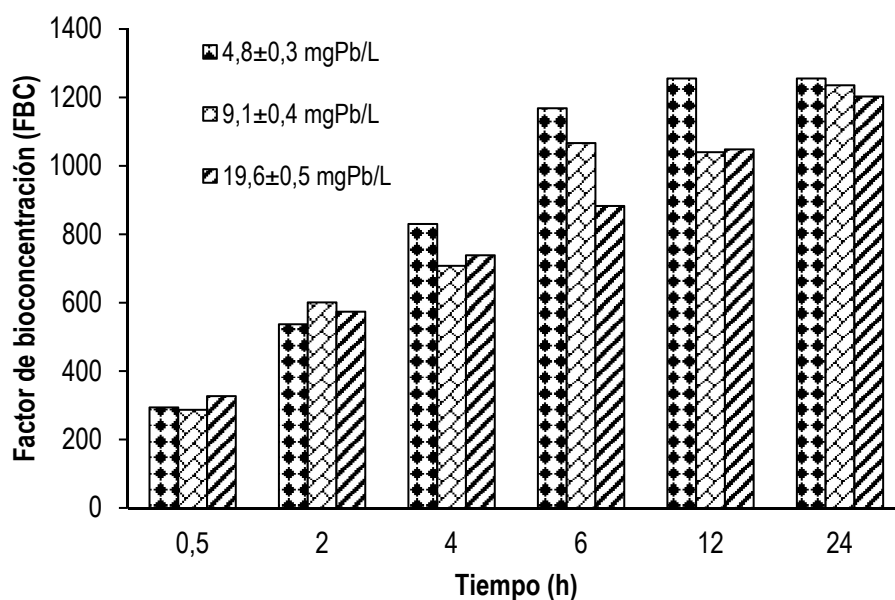


Figura 11. Factor de bioconcentración (FBC) de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.

Como se observa en la Figura 11, los valores calculados para el FBC en *Salvinia biloba* Raddi fueron aumentando en función del tiempo de exposición para las tres C_i de Pb^{2+} ensayadas. Cuando las plantas se expusieron a $4,8 \pm 0,3$ y $9,1 \pm 0,4$ mg/L de Pb^{2+} , el FBC superó el valor de corte (>1000) en las primeras 6 h; mientras que para la C_i más alta ($19,6 \pm 0,5$ mg/L) este valor recién se alcanzó a partir de las 12 h de exposición al metal. A las 24 h, el FBC alcanzó un *plateau* en torno a un valor cercano a 1200 [FBC= $1255(4,8 \pm 0,3)$; FBC= $1235(9,1 \pm 0,4)$; FBC= $1202(19,6 \pm 0,5)$]. Estos resultados demuestran la capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para hiperacumular Pb^{2+} . Esta capacidad hiperacumuladora, ya reportada para otras especies del género *Salvinia*, podría deberse principalmente a las características fisicoquímicas de su raíz (Sánchez-Galván y col., 2008).

Algunos autores han sugerido que establecer un valor para el FBC superior a 1000, con la intención de definir a una planta como especie hiperacumuladora, debe ser interpretado con reserva, ya que el mismo depende de varios factores tales como la C_i del metal en la muestra de agua, el tiempo de exposición (ver Figura 11) y el grado de toxicidad del metal hacia la planta (Wang y col., 2002). Por ejemplo, se ha reportado un FBC para *Eichhornia crassipes* de 420 al exponer esta planta a una C_i de Pb^{2+} de 0,1 mg/L. Sin embargo, cuando esta C_i se incrementó a 10, 20, 40 y 80 mg/L, el FBC disminuyó significativamente alcanzando valores por debajo de 10 (Wang y col., 2002). En otro estudio, Uysal y Taner (2009) reportaron un FBC=5240 para *Lemna minor* expuesta a 0,1 mg/L de Pb^{2+} . Pero nuevamente, al incrementar la C_i de Pb^{2+} a 1, 5 y 10 mg/L, los valores calculados para el FBC disminuyeron drásticamente (1985, 596 y 385, respectivamente). Dogan y col. (2009) trabajando con *Elodea canadensis* expuesta a una C_i de Pb^{2+} de 1, 10 y 100 mg/L obtuvieron valores para el FBC de 175, 70 y 10, respectivamente. Estos trabajos ponen en evidencia que este parámetro puede verse drásticamente disminuido debido a la toxicidad del metal, y/o a su efecto sobre el metabolismo de la planta.

Adicionalmente al cálculo del FBC, se han propuesto otros parámetros para evaluar la capacidad de eliminación de metales pesados en plantas acuáticas, tales como el factor de adsorción (FAD) y el factor de acumulación intracelular (FAI) (Sánchez-Galván y col., 2008). Ambos parámetros establecen una diferencia entre la habilidad de una especie vegetal para adsorber el metal en su superficie o para acumularlo intracelularmente, permitiendo cuantificar el grado de jerarquía de los dos mecanismos mayormente involucrados en la fitorremediación de contaminantes.

La Figura 12 muestra los valores calculados para el FAD en *Salvinia biloba* Raddi. Como puede observarse, estos valores aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo de exposición para las 3 C_i de Pb^{2+} evaluadas. Al final del ensayo (24 h), los valores obtenidos para el FAD fueron 1149, 953 y 858 para $4,8 \pm 0,3$; $9,1 \pm 0,4$ y $19,6 \pm 0,5$ mg/L de Pb^{2+} , respectivamente. Valores similares fueron reportados por Sánchez-Galván y col. (2008) en un sistema análogo operado con *Salvinia minima* expuesta a concentraciones de Pb^{2+} semejantes a las utilizadas en el presente trabajo. Por ejemplo, estos autores informaron un $FAD=1425$ para una C_i de Pb^{2+} de $4,70 \pm 0,06$ mg/L. Es interesante notar que el FAD disminuye a medida que aumenta la C_i del contaminante en la muestra. Esta disminución se debe a una saturación de los sitios de unión al metal en la superficie de la raíz. Cuanto mayor es la concentración del metal en la solución, más rápidamente se ocuparán los sitios activos en la biomasa hasta alcanzar un estado de equilibrio permaneciendo una mayor cantidad del metal en la solución (es decir, sin adherir). Por lo tanto, el cociente disminuye ($FAD=C_{\text{metal adsorbido}}/C_{\text{metal en agua}}$). De esta manera, la capacidad de adsorción del metal por área superficial también se verá disminuida a lo largo del tiempo con el incremento de la C_i , tal como se observa en la Figura 12, hasta tanto no se dé la translocación del contaminante desde el entorno extracelular al intracelular de manera de liberar un nuevo sitio de unión.

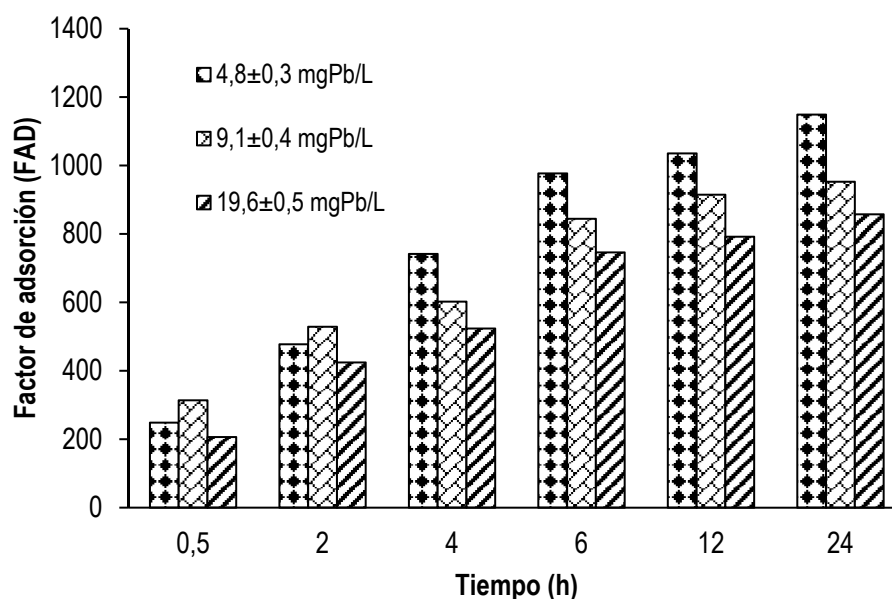


Figura 12. Factor de adsorción (FAD) de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.

La Figura 13 muestra los valores calculados para el FAI, a lo largo del tiempo, con las 3 C_i de Pb^{2+} ensayadas. Es evidente el incremento de este parámetro a medida que aumenta el tiempo de exposición del contaminante a la biomasa, aunque su pendiente de crecimiento es más lenta en las primeras horas, inversamente a lo observado para el FAD. Al final de período de ensayo (24 h), el mayor valor alcanzado para este factor (FAI=354) fue para la C_i de Pb^{2+} más alta (19,6±0,5 mg/L), seguido por FAI=211 y FAI=179 correspondientes a 9,1±0,4 y 4,8±0,3 mg/L, respectivamente. Sánchez-Galván y col. (2008) reportaron valores similares para *Salvinia minima* expuesta a Pb^{2+} en un rango de concentraciones equivalente al empleado en el presente estudio. Por ejemplo, estos autores informaron un valor de FAI=245 para una C_i de Pb^{2+} de 4,70±0,06 mg/L. En un estudio más reciente, también realizado sobre *Salvinia minima* pero en exposición al Cu^{2+} , Casares (2012) informó valores de FAI iguales a 28,28, 45,87 y 40,88

empleando C_i del metal de 5,2; 17,5 y 21 mg/L, respectivamente. Estos valores son muy inferiores a los obtenidos para el Pb^{2+} . Nuestros resultados confirman la capacidad hiperacumuladora de Pb^{2+} de *Salvinia biloba* Raddi, en concordancia con lo reportado previamente para otras especies del género *Salvinia*.

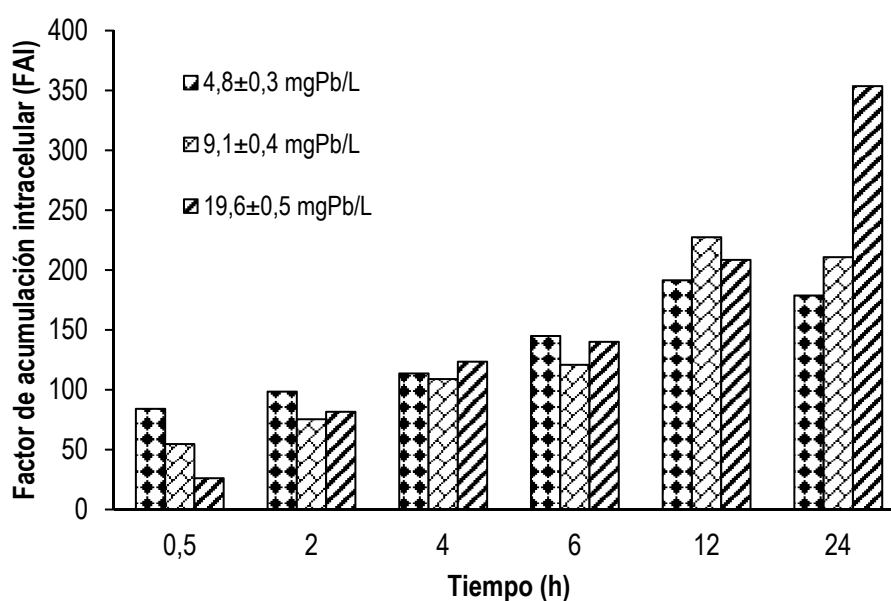


Figura 13. Factor de acumulación intracelular (FAI) de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.

Adicionalmente, en las primeras horas de exposición la relación FAD/FAI fue superior a 3 para todas las C_i . Conforme fue avanzando el tiempo de exposición, dicha relación fue disminuyendo. Estos resultados confirman que en las primeras etapas del proceso de fitorremediación la adsorción superficial es el mecanismo más significativo dado que es un proceso rápido de carácter fisicoquímico, mientras que la acumulación intracelular es un proceso

más lento y se hace más importante a medida que transcurre el tiempo de exposición al metal (Sánchez-Galván, 2010). Varios autores han atribuido la capacidad que poseen varias especies vegetales para remover metales por adsorción a las características químicas superficiales de sus raíces. En este sentido, las especies con una gran capacidad para remover metales pesados en solución tendrían membranas o paredes celulares con abundantes grupos carboxilo, sulfhidrilo, amino y fosfato, y una gran superficie específica posibilitando una mayor biosorción de los metales (Bates y col, 1982). Schneider y Rubio (1999) determinaron que *Salvinia biloba* (*Savinia herzogii*) posee una raíz con una superficie específica muy alta (270 m²/g). Adicionalmente, se ha descrito que los grupos funcionales responsables de la adsorción de metales en *Salvinia* incluyen grupos carboxilo, hidroxilo, sulfato, sulfhidrilo, fosfato, amino, amida, imina e imidazol (Demirbas, 2008; Gardea y col., 2004), siendo los carboxilatos y fosfatos aquellos que directamente afectan la capacidad de adsorción de esta macrófita (Rakhshae y col., 2009).

4.4. Cinética y equilibrio de adsorción de Pb²⁺ en *Salvinia biloba* Raddi

La adsorción es un proceso fisicoquímico y una propiedad tanto de la biomasa viable como de la no viable. La eliminación de contaminantes ambientales a través del uso de biomasa ha sido postulada, desde hace años, como una biotecnología prometedora para la remediación de aguas debido a su simplicidad, eficiencia y alta disponibilidad de materiales biológicos con características adsorbentes (Gadd, 2009; Fomina y Gadd, 2014). La mayoría de los reportes sobre bioadsorción de metales pesados se han efectuado sobre distintos tipos de biomasa no viable, no obstante el proceso de adsorción que ocurre cuando se emplea biomasa viable representa uno de los principales mecanismos de eliminación de contaminantes en plantas superiores.

El perfil de adsorción de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición se muestra en la Figura 14. Claramente, se observa un incremento en la capacidad de adsorción del metal (q) a medida que aumenta la C_i de éste en la solución, especialmente desde $4,8\pm 0,3$ a $19,6\pm 0,5$ mg/L.

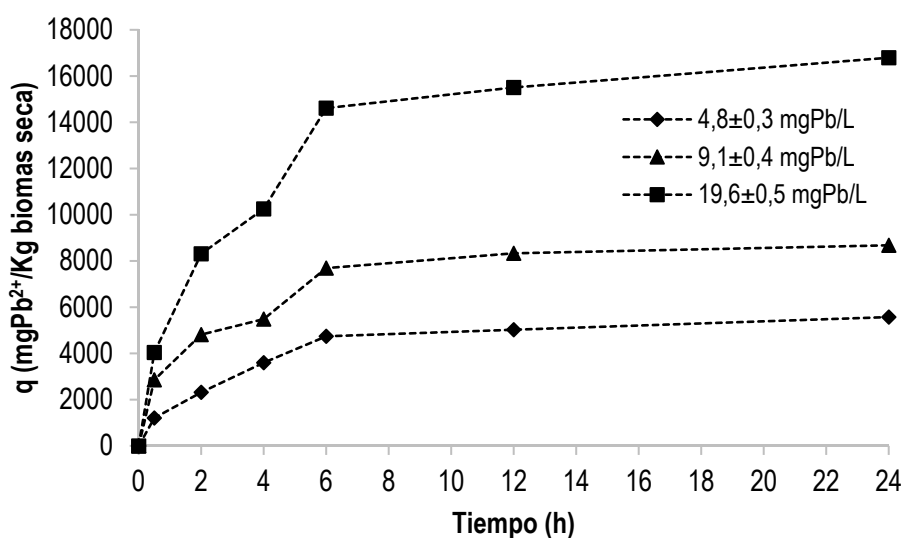


Figura 14. Adsorción de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi a diferentes C_i y tiempos de exposición.

En la Figura 14, también puede evidenciarse que el proceso de eliminación de Pb^{2+} en esta macrófita involucra dos etapas: una rápida y otra más lenta. La etapa rápida ocurre durante las primeras 6 h de contacto, y es la etapa en la que se capta la mayor cantidad del contaminante. De hecho, para las concentraciones $4,8\pm 0,3$ mg/L y $9,1\pm 0,4$ mg/L de Pb^{2+} no se evidenciaron cambios importantes en el parámetro q después de las primeras 6 h. Por el contrario, para la C_i de Pb^{2+} más alta ensayada ($19,6\pm 0,5$ mg/L), la cantidad de metal adsorbido a la biomasa se incrementó considerablemente entre las 6 h y las 24 h (Figura 14). La rapidez en

la captación del metal durante las primeras horas de ensayo estaría sugiriendo la existencia de un importante fenómeno de adsorción fisicoquímica que podría incluir la formación de complejos (quelación) y/o fenómenos de intercambio iónico (Suñe y col., 2007). Los mecanismos responsables de la etapa lenta involucrarían procesos de tipo biológico como ser la captación intracelular del metal por transporte activo a través en la membrana plasmática de las células.

Los modelos cinéticos se utilizan frecuentemente para predecir el mecanismo de unión de metales a diferentes macrófitas. El proceso de adsorción de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi se ajustó satisfactoriamente a un modelo de cinética de segundo orden para todas las concentraciones ensayadas, con elevados coeficientes de determinación (Tabla 8). La capacidad de adsorción en el equilibrio (q_e) y la velocidad inicial de adsorción (h) se incrementaron significativamente a medida que aumentó el contenido del metal en la solución. Esto puede explicarse debido a que el aumento en la concentración del contaminante en la muestra provoca un aumento de las interacciones entre el metal y la biomasa. En cambio, la constante de velocidad (k_2) disminuyó conforme el aumento de la C_i , alcanzando su valor más bajo a la mayor concentración de Pb^{2+} ensayada. En este caso, cuando se utiliza la misma cantidad de adsorbente (20,0 g en este trabajo), ésta puede verse más rápidamente saturada a medida que aumenta la concentración del metal en la muestra, disminuyendo la velocidad del proceso de adsorción. Valores similares a los aquí reportados para los parámetros q_e , h y k_2 han sido previamente descritos por Sánchez-Galván y col. (2008) para un sistema de trabajo análogo operado con *Salvinia minima*.

El modelo de pseudo segundo orden han sido utilizado para describir el comportamiento de reacciones químicas de adsorción de diferentes metales en materiales altamente heterogéneos (Paliulis, 2006). Cuando los datos experimentales ajustan satisfactoriamente a este modelo, el tipo de interacción puede ser descrito como quimioadsorción (Aksu, 2001). Por

lo tanto, parece posible presumir que el mecanismo de adsorción de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi ocurre principalmente por la formación de enlaces químicos (interacciones fuertes), como por ejemplo, intercambio iónico. De hecho, se ha reportado que iones tales como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} y Mn^{2+} son liberados a la solución acuosa durante el proceso de adsorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , y Ni^{2+} en diferentes plantas acuáticas, entre ellas, *Spirodela intermedia* (Miretzky y col., 2006), *Eichhornia crassipes*, *Valisneria spiralis*, *Pistia stratiotes* (Verma y col., 2008) y *Potamogeton lucens* (Schneider y Rubio, 1999).

Tabla 8. Constantes del modelo de cinética de pseudo primer orden y pseudo segundo orden para la adsorción de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi.

C_i (mg/l)	Cinética de pseudo primer orden			Cinética de pseudo segundo orden			
	q_e (mg/g)	k_1 (1/h)	R^2	q_e (mg/g)	k_2 (g/mg.h)	h (mg/g.h)	R^2
4,8±0,3	4,162	0,187	0,8968	6,169	0,064	2,418	0,9961
9,1±0,4	6,538	0,252	0,9559	9,328	0,062	5,435	0,9953
19,6±0,5	12,473	0,205	0,9071	18,349	0,025	8,264	0,9959

Los modelos de isotermas de adsorción de Langmuir y Freundlich han sido ampliamente utilizados para describir el comportamiento de distintos materiales adsorbentes durante la eliminación de contaminantes en aguas residuales (Demirbas, 2008). En este trabajo, los datos experimentales se ajustaron satisfactoriamente a ambos modelos con altos coeficientes de determinación ($R^2 > 0,96$) (Tabla 9). Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos para el modelo de Langmuir y de Freundlich, se concluye que este último es el que mejor representa la adsorción de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi. De acuerdo a este modelo, la adsorción de Pb^{2+}

ocurriría en múltiples capas de biomasa, de superficie heterogénea. Estos resultados son compatibles con la existencia de diferentes grupos funcionales responsables de la adsorción de metales en *Salvinia* (Gardea y col., 2004; Demirbas, 2008; Rakhshae y col., 2009). Como se mencionó anteriormente, un proceso de fitorremediación exitoso depende, en gran parte, de las características de la superficie de la planta ya que el contenido de macromoléculas (hidratos de carbono, proteínas, lípidos) y grupos funcionales son los que determinan el mecanismo de unión del metal a la biomasa (Sánchez-Galván y col., 2008).

Por otro lado, los supuestos en los que se basa el modelo de Langmuir casi nunca se cumplen en los procesos de bioadsorción. La biomasa suele contener más de un grupo funcional que contribuye al proceso y, cada uno, posee afinidad diferente por el metal. A pesar de esto, se suele utilizar su ecuación para ajustar los datos experimentales obtenidos a partir de los estudios de fitorremediación de contaminantes empleando diferentes bioadsorbentes.

Tabla 9. Parámetros obtenidos a partir de los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich para el proceso de adsorción de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi.

Isoterma de adsorción	Parametros	Valor
Langmuir	q_{max} (mg/g)	21,786
	b (L/mg)	2,623
	R^2	0,9685
Freundlich	K (mg/g)(L/mg) ^{1/n}	15,020
	n	2,256
	R^2	0,9921

La constante de Freundlich (K_F) y el coeficiente de heterogeneidad (n) son dos parámetros asociados con la capacidad y la intensidad de la adsorción, respectivamente. Si el parámetro $n > 1$ esto indica una interacción muy fuerte entre el sorbato y el adsorbente. El valor hallado en este trabajo ($n=2,256$) para la adsorción de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi (Tabla 9) es congruente con la existencia de enlaces químicos (interacciones fuertes) entre el metal y la biomasa. Adicionalmente, Sánchez-Galván (2010) reportó valores de K_F ($8,31 \pm 0,18$ (mg/g).(L/mg) $^{1/n}$) y n ($1,57 \pm 0,11$) para la adsorción de Pb^{2+} por *Salvinia minima* menores a los obtenidos en el presente estudio. Estos resultados sugieren que *Salvinia biloba* Raddi podría ser una especie mejor adaptada para la fitorremediación de aguas contaminadas con Pb^{2+} .

4.5. Acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi

La Figura 15 muestra la acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi. Como puede observarse, la cantidad de metal acumulado en la biomasa se vio afectada positivamente por la C_i . Cuando las plantas se expusieron a $19,6 \pm 0,5$ mg/L de Pb^{2+} , el contenido intracelular de este metal en las primeras 6 h de ensayo fue casi 4 veces superior (2744 vs. 704 mg Pb^{2+} /kg biomasa seca) al obtenido para la C_i más baja ($4,8 \pm 0,3$ mg/L). Al final del periodo evaluado (24 h), esta diferencia fue aún mayor (6925 vs. 868 mg Pb^{2+} /kg biomasa seca). Por lo tanto, también existe un efecto positivo del tiempo de exposición sobre la cantidad de Pb^{2+} que puede incorporarse en las células, aunque esta apreciación sólo pudo evidenciarse a la C_i de Pb^{2+} más alta ensayada. En ésta, se observó un incremento cercano al 70 % en la cantidad de metal acumulado intracelularmente entre las 12 h y las 24 h de exposición (24 h). El contenido intracelular de Pb^{2+} al final del ensayo, para los 3 tratamientos realizados, alcanzó los siguientes valores (expresados en mg Pb^{2+} /kg de biomasa seca): T_1 (868) $> T_2$ (1920) $> T_3$ (6925).

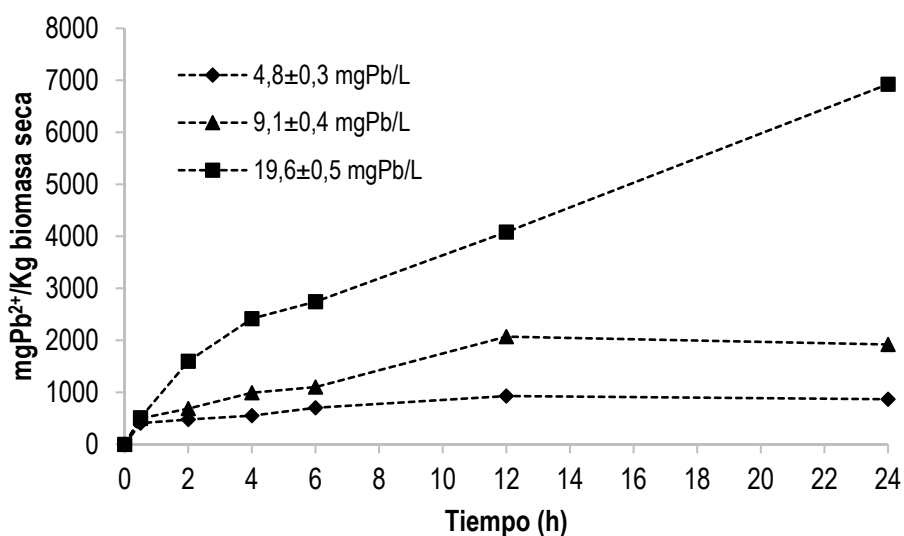


Figura 15. Acumulación intracelular de Pb²⁺ en *Salvinia biloba* Raddi.

Adicionalmente, después de 24 h de exposición al metal, *Salvinia biloba* Raddi no mostró signos visibles de toxicidad para todas las C_i probadas (Figura 16).

Las elevadas tasas de acumulación intracelular de Pb²⁺ en *Salvinia biloba* Raddi, demostradas en el presente estudio, son similares a los valores reportados previamente por otros autores para *Salvinia minima* (Sánchez-Galván, 2010; Fuentes y col., 2014; Leal y col., 2016). Estos datos sustentan la clasificación de muchas de las especies del género *Salvinia* como plantas hiperacumuladoras de Pb²⁺ (Dhir, 2009).



Figura 16. *Salvinia biloba* Raddi luego de 24 h de exposición a $19,6\pm 0,5$ mg/L de Pb^{2+} .

En general, los iones metálicos penetran en las plantas principalmente a través del sistema radicular en donde la mayor cantidad del metal se encuentra unido a la pared celular (Samardakiewicz y Wozny, 2000; Antosiewicz, 2005). En ésta, los polisacáridos celulosa, lignina y hemicelulosa juegan un papel esencial en la complejación de los metales (Seregin e Ivanov, 2001; Gardea y col., 2004; Marmioli y col. 2005; Polec y col., 2007). Sin embargo, la alta capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para acumular Pb^{2+} podría atribuirse, además del contenido de carbohidratos de su raíz, a la síntesis de proteínas con grupos tiol. Estrella y col. (2009) reportaron que el catión Pb^{2+} induce la producción de fitoquelatinas en *Salvinia minima* Baker y que éstas proteínas podrían estar involucradas en procesos de desintoxicación como parte de un mecanismo de tolerancia al metal desarrollado por esta planta. En un estudio relacionado, Mishra y col. (2006) evaluaron la producción de fitoquelatinas en *Ceratophyllum demersum* (planta acuática) expuesta a diferentes C_i de Pb^{2+} , observando un incremento en la síntesis de

estas proteínas a medida que la concentración del metal en la solución se incrementó desde 2,19 a 10,98 mg/L.

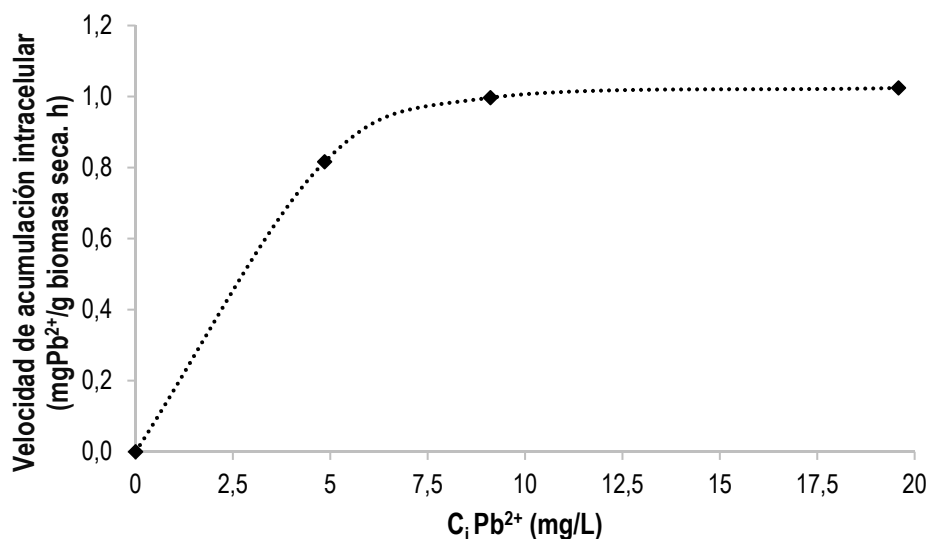


Figura 17. Velocidad inicial de acumulación intracelular de Pb²⁺ en *Salvinia biloba* Raddi en función de la concentración inicial del metal en la solución.

El modelo de Michaelis-Menten ha sido anteriormente utilizado para inferir el mecanismo responsable del transporte de especies de arsénico en plantas de arroz (Abedin y col., 2002). Los valores de velocidad inicial de acumulación intracelular de Pb²⁺ en *Salvinia biloba* Raddi en función de la C_i del metal en la muestra ajustaron satisfactoriamente a este modelo (Figura 17 y Tabla 10). Estos resultados sugieren que el Pb²⁺ es incorporado mediante transporte activo facilitado por transportadores de membrana y/o procesos de difusión facilitada a través de

canales iónicos presentes en la membrana plasmática de las células vegetales (Sánchez-Galván, 2010).

La constante de Michaelis-Menten (K_m) es un parámetro cinético característico de cada biomasa y su valor es independiente de la concentración del sustrato. El valor de K_m indica la afinidad que posee una determinada biomasa por un sustrato específico, siendo esta afinidad mayor cuanto menor es el valor K_m . Sánchez-Galván y col. (2008), utilizando un modelo de estudio similar al desarrollado en este trabajo, reportaron un valor de $V_{m\acute{a}x}=2,01\pm 0,012$ mg/g bs.h y $K_m=15,69\pm 0,67$ mg/L para la acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia minima*. En este trabajo, el valor de $V_{m\acute{a}x}$ calculado para *Salvinia biloba* Raddi fue similar al reportado por estos autores para *Salvinia minima*. Sin embargo, se obtuvo un valor de K_m mucho menor ($K_m=1,94$ mg/L), indicando que *Salvinia biloba* Raddi sería una especie con mayor afinidad para bioacumular Pb^{2+} . Este resultado es compatible con el mayor valor hallado para el coeficiente de heterogeneidad de Freundlich ($n=2,256$, ver Tabla 9) en *Salvinia biloba* Raddi respecto al informado por Sánchez-Galván y col. (2008) para *Salvinia minima* ($n=1,57$).

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la acumulación intracelular de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten.

Modelo	$V_{m\acute{a}x}$ (mg/g.h)	k_m (mg/L)	R^2
Michaelis-Menten	1,16	1,94	0,9204

Se ha demostrado que elementos no esenciales, tales como Cd^{2+} y Pb^{2+} , utilizan canales y transportadores de la membrana plasmática de las células vegetales que normalmente

funcionan en la acumulación de iones esenciales como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} (Clemens, 2001). Este hecho radica en la relativa similitud de sus radios iónicos y de su estado de oxidación (carga eléctrica), por lo cual pueden competir por su entrada a las células (Garland y Wilkins, 1981). Por ejemplo, se ha sugerido que la presencia de Ca^{2+} podría ser la causa de la baja concentración de Pb^{2+} encontrada en los protoplastos de *Funaria hygrometrica* (Krzeslowska y col, 2004). Asimismo, se ha reportado una inhibición debida a la presencia de Mg^{2+} en el transporte transmembrana durante la acumulación de Pb^{2+} en raíces de *Oryza sativa* (Kim y col., 2002). Adicionalmente, Sunkar y col. (2000) han sugerido que la proteína NtCBP4 de la planta de tabaco y la proteína AtCNGC1 de *Arabidopsis thaliana* son componentes del sistema de transporte de Pb^{2+} en células vegetales. También se ha encontrado que la acumulación de Pb^{2+} en la raíz de *Triticum aestivum* es parcialmente mediada por canales de Ca^{2+} y K^+ (Wang y col., 2007). No obstante, poco se conoce acerca de los mecanismos que utilizan los metales para ingresar a las células de plantas acuáticas flotantes. Olguín y col. (2005) ha sugerido que la acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia minima* ocurre mediante canales de Ca^{2+} . Sin embargo, aún se necesita más evidencia experimental que sustente esta hipótesis.

V. CONCLUSIONES

1. *Salvinia biloba* Raddi fue capaz de eliminar más del 90 % del Pb^{2+} presente en muestras de agua sintética contaminadas artificialmente en tan sólo 24 h, sin mostrar toxicidad en un amplio intervalo de concentraciones.
2. La eliminación de Pb^{2+} de la columna de agua en un sistema en lotes operado con *Salvinia biloba* Raddi respondió a un modelo de cinética de primer orden.
3. Los valores hallados para el factor de bioconcentración (FBC), factor de adsorción (FAD) y factor de acumulación intracelular (FAI) indicaron que *Salvinia biloba* Raddi puede definirse como una especie vegetal hiperacumuladora de Pb^{2+} , donde la adsorción es el mecanismo principal involucrado en la eliminación de este contaminante.
4. De acuerdo al modelo de cinética de adsorción de pseudo segundo orden se determinó que la quimioadsorción es el mecanismo predominante en la eliminación de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi. Además, su capacidad como bioadsorbente puede ser descrita mediante el modelo de Freundlich.
5. La alta capacidad de adsorción de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi posiblemente se encuentre relacionada con la gran superficie específica y las características fisicoquímicas de su raíz.
6. El proceso de acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi puede ser descrito a través del modelo cinético de Michaelis-Menten.

VI. PROPUESTAS A FUTURO

1. Estudiar las características fisicoquímicas de la raíz de *Salvinia biloba* Raddi, como así también el papel de los diferentes grupos funcionales en la adsorción de Pb^{2+} .
2. Analizar si la síntesis de compuestos con grupos tiol (glutatión, metalotioneínas, fitoquelatinas) es responsable de la gran acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia biloba* Raddi.
3. Investigar desde el punto vista de la proteómica los diferentes mecanismos que adopta *Salvinia biloba* Raddi para responder a la toxicidad del Pb^{2+} .
4. Evaluar la capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para eliminar metales en un sistema compuesto (multimetalo) y, más específicamente, en una muestra de un efluente real (agua residual).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, S. H., Ismail, I. M., Mostafa, T. M., & Sulaymon, A. H. (2014). Biosorption of heavy metals: a review. *Journal of Chemical Science and Technology Oct*, 3(4), 74-102.

Abedin, M. J., Feldmann, J., & Meharg, A. A. (2002). Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiology*, 128(3), 1120-1128.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2005b). Toxicological profile for Zinc (Update). Atlanta, GA: U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1990). Toxicological profile for silver. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1999). Toxicological profile for Mercury. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2003). Toxicological profile for Selenium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2004). Toxicological profile for Copper. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2005a). Toxicological profile for Nickel (Update). Atlanta, GA: U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007a). Toxicological profile for Arsenic. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007b). Toxicological profile for Barium and compounds (*Update*). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007c). Toxicological profile for Lead (*Update*). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012a). Toxicological profile for Cadmium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012b). Toxicological profile for Chromium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Ainza, C., Trevors, J., & Saier, M. (2010). Environmental mercury rising. *Water, Air, and Soil Pollution*, 205(1), 47-48.

Aksu, Z. (2001). Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modelling. *Biochemical Engineering Journal*, 7(1), 79-84.

Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF) (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition. Washington DC, USA.

Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Thangavel, P., Roychoudhury, A., Gill, S. S., Rodrigo, M. A. M., Adam, V., Fujita, M., Kizek, R., Duarte, A. C., Pereira, E., & Ahmad, I. (2015). Jaks of metal/metalloid chelation trade in plants - an overview. *Front. Plant Sci.* 6:192.

- Anjum, N. A., Umar, S., & Iqbal, M. (2014). Assessment of cadmium accumulation, toxicity, and tolerance in Brassicaceae and Fabaceae plants - implications for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(17), 10286-10293.
- Antosiewicz, D. M. (2005). Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environmental Pollution*, 134(1), 23-34.
- AOAC (1990). Official methods of analysis. Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Arrivault, S., Senger, T., & Krämer, U. (2006). The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*, 46(5), 861-879.
- Awofolu, O. R. (2005). A survey of trace metals in vegetation, soil and lower animal along some selected major roads in metropolitan city of lagos. *Environmental monitoring and Assessment*, 105(1), 431-447.
- Baker, A. J., & Whiting, S. N. (2002). In search of the holy grail—a further step in understanding metal hyperaccumulation?. *New phytologist*, 155(1), 1-4.
- Bates, S. S., Tessier, A., Campbell, P. G., & Buffle, J. (1982). Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas varuiabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *Journal of Phycology*, 18(4), 521-529.

- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M. B., & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal (loid)s contaminated soils—to mobilize or to immobilize?. *Journal of Hazardous Materials*, 266, 141-166.
- Burton, D. T., Turley, S. D., Fisher, D. J., Green, D. J., & Shedd, T. R. (2006). Bioaccumulation of total mercury and monomethylmercury in the earthworm *Eisenia fetida*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 170(1-4), 37-54.
- Cameselle, C., Chirakkara, R. A., & Reddy, K. R. (2013). Electrokinetic-enhanced phytoremediation of soils: status and opportunities. *Chemosphere*, 93(4), 626-636.
- Cañizares, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131-143.
- Carpaena, R. O., & Bernal, M. P. (2007). Claves de la fitorremediación: Fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Casares, M. V. (2012). *Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características fisicoquímicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 167 p.

- Casares, M. V., de Cabo, L. I., Seoane, R. S., & de Iorio, A. F. (2014). Copper removal efficiency in a surface water and compartmentalization in the floating fern *Salvinia minima*. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*, 2(6-1): 42-47.
- Chakraborty, R., Karmakar, S., Mukherjee, S., & Kumar, S. (2014). Kinetic evaluation of chromium (VI) sorption by water lettuce (*Pistia*). *Water Science and Technology*, 69(1): 195-201.
- Chen, M., Zhang, L. L., Li, J., He, X. J., & Cai, J. C. (2015). Bioaccumulation and tolerance characteristics of a submerged plant (*Ceratophyllum demersum* L.) exposed to toxic metal lead. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 313-321.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212(4), 475-486.
- Código Alimentario Argentino (CAA) (2004.) Capítulo XII, "Bebidas hídricas, agua y aguas gasificadas" – Agua potable: Art. 982.
- Das, K. K., Das, S. N., & Dhundasi, S. A. (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 412.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water research*, 37(18), 4311-4330.

- De la Sota, E. R. (1962). Contribución al conocimiento de las Salviniaceae neotropicales. *Darwiniana*, 12(3): 465-520.
- De la Sota, E. R. (1976). Sinopsis de las especies argentinas del género *Salvinia* Adanson (Salviniaceae-Pteridophyta). *Bol. Soc. Arg. Bot.*, 17(1 -2): 47-50.
- De La Sota, E. R. (1995). Nuevos sinónimos en *Salvinia* Ség. (Salviniaceae-Pteridophyta). *Darwiniana*, 309-313.
- Delgadillo, A. E., González, C. A., Prieto, F., Villagómez, J. R., & Acevedo, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2), 597- 612.
- Demirbas, A. (2008). Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 157(2), 220-229.
- Dhir, B. (2009). *Salvinia*: An aquatic fern with potential use in phytoremediation. *Environment & We: An International Journal of Science and Technology*, 4: 23-27.
- Dhir, B. (2013a). Introduction. In, *Phytoremediation: Role of aquatic plants in environmental clean-up*. Springer India. pp. 1-20.
- Dhir, B. (2013b). Mechanism of removal of contaminants by aquatic plants. In, *Phytoremediation: Role of aquatic plants in environmental clean-up*. Springer India. pp. 51-64.

- Dionisio, E. (2012). *Aprovechamiento de residuos vegetales para la eliminación de cobre presente en medios acuosos mediante biosorción*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Granada, España. 409 p.
- Dixit, R., Wasiullah, E., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B.P., Jai P. Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H., & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.
- Dogan, M., Saygideger, S. D., & Colak, U. (2009). Effect of lead toxicity on aquatic macrophyte *Elodea canadensis* Michx. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(2), 249-254.
- Doran, P. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 468 p.
- Duda-Chodak, A., & Blaszczyk, U. (2008). The impact of nickel on human health. *Journal of Elementology*, 13(4), 685-693.
- Dushenkov, S., Vasudev, D., Kapulnik, Y., Gleba, D., Fleisher, D., Ting, K. C., & Ensley, B. (1997). Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environmental Science & Technology*, 31(12), 3468-3474.

- Dushenkov, V., Kumar, P. N., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental science & technology*, 29(5), 1239-1245.
- Estrella, N., Mendoza, D., Moreno, R., González, D., Zapata, O., Martínez, A., & Santamaría, J. M. (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology*, 91(4), 320-328.
- Favas, P. J., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., & Paul, M. S. (2014). Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. In: *Environmental risk assessment of soil contamination* (Ed. Hernández, M. C.). INTECH. pp. 485-517.
- Fayiga, A. O., Ma, L. Q., Cao, X., & Rathinasabapathi, B. (2004). Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*, 132(2), 289-296.
- Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 47-58.
- Fomina, M., & Gadd, G. M. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*, 160, 3-14.

- Fuentes, I. I., Espadas, F., Talavera, C., Fuentes, G., & Santamaría, J. M. (2014). Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effect on plant physiological processes. *Aquatic Toxicology*, 155, 142-150.
- Gadd, G. M. (2009). Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(1), 13-28.
- García, D. (2006). *Efectos fisiológicos y compartimentación radicular en plantas de Zea mays L. expuestas a la toxicidad por plomo*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. 131 p.
- Gardea., J. L., De la Rosa, G., & Peralta., J. R. (2004). Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review. *Pure and Applied Chemistry*, 76(4), 801-813.
- Garland, C. J., & Wilkins, D. A. (1981). Effect of calcium on the uptake and toxicity of lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L. *New Phytologist*, 87(3), 581-593.
- Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., & Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(2), 180-193.

- Gulati, K., Banerjee, B., Bala Lall, S., & Ray, A. (2010). Effects of diesel exhaust, heavy metals and pesticides on various organ systems: possible mechanisms and strategies for prevention and treatment. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(7), 710–721.
- Hess, R., & Schmid, B. (2002). Zinc supplement overdose can have toxic effects. *J. Paediatr. Haematol. Oncol*, 24, 582-584.
- Ho, Y. S. (2006). Second-order kinetic model for the sorption of cadmium onto tree fern: A comparison of linear and non-linear methods. *Water Research*, 40(1), 119-125.
- Ho, Y. S., & McKay, G. (1998). Kinetic models for the sorption of dye from aqueous solution by wood. *Process Safety and Environmental Protection*, 76(2), 183-191.
- Ho, Y. S., & McKay, G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 34, 451– 465.
- Hurd, N. A., & Sternberg, S. P. (2008). Bioremoval of aqueous lead using *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation*, 10(4), 278-288.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). (2003). Segunda encuesta nacional de innovación y conducta tecnológica de las empresas argentinas 1998-2001. 1ª Ed., Buenos Aires, Argentina.

- Iqbal, M. P. (2012). Lead pollution-a risk factor for cardiovascular disease in Asian developing countries. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1), 289.
- Jadia, C. D., & Fulekar, M. H. (2009). Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. *African Journal of Biotechnology*, 8(6), 921-928.
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182.
- Kahle, J., & Zauke, G. P. (2003). Trace metals in antarctic copepods from the Weddell sea (Antarctica). *Chemosphere*, 51(5), 409-417.
- Kanneganti, V., & Gupta, A. K. (2008). Wall associated kinases from plants - an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14(1-2), 109-118.
- Khan, M. A., Ahmad, I., & Rahman, I. U. (2007). Effect of environmental pollution on heavy metals content of *Withania somnifera*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54(2), 339-343.
- Khan, S., Hesham, A. E. L., Qiao, M., Rehman, S., & He, J. Z. (2010). Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(2), 288-296.
- Kim, Y. Y., Yang, Y. Y., & Lee, Y. (2002). Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum*, 116(3), 368-372.

- Lazaridis, N. K., & Asouhidou, D. D. (2003). Kinetics of sorption removal of chromium (VI) from aqueous solutions by calcined Mg–Al–CO₃ hydrotalcite. *Water Research*, 37, 2875–2882.
- Leal, D. A., Espadas, F., Sáenz, L., Talavera, C., & Santamaría, J. M. (2016). Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic Toxicology*, 171, 37-47.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E. W., & Lee, Y. (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138(2), 827-836.
- Lu, L., Tian, S., Yang, X., Wang, X., Brown, P., Li, T., He, Z. (2008). Enhanced root-to-shoot translocation of cadmium in the hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3203–3213.
- Lv, Y., Deng, X., Quan, L., Xia, Y., & Shen, Z. (2013). Metallothioneins BcMT1 and BcMT2 from *Brassica campestris* enhance tolerance to cadmium and copper and decrease production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, 367(1-2), 507-519.
- Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G., & Marmioli, N. (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 1-13.
- Maine, M. A., Duarte, M., & Suñé, N. (2001). Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Research*, 35(11): 2629-2634.

- Maine, M. A., Suñé, N. L., & Lager, S. C. (2004). Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research*, 38(6), 1494-1501.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., & Marmioli, N. (2005). Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: An X-ray spectroscopy-based analysis. *Environmental Pollution*, 134(2), 217-227.
- Martínez, O. G., & Cacharani, D. (2011). Salviniaceae. *Aportes Botánicos de Salta-Serie Flora*, 11(1), 1-7.
- Meharg, A. A. (2005). Mechanisms of plant resistance to metal and metalloids and potential biotechnological applications. In *Root physiology: From gene to function* (Editors: Lambers, H. & Colmer, T. D). Springer Netherlands. Pp. 163-174.
- Mejare, M., & Bülow, L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 19(2), 67-73.
- Memon, A. R., Aktoprakligil, D., Özdemir, A., & Vertii, A. (2001). Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turkish Journal of Botany*, 25(3), 111-121.
- Metali, F., Salim, K. A., & Burslem, D. F. (2012). Evidence of foliar aluminium accumulation in local, regional and global datasets of wild plants. *New Phytologist*, 193(3), 637-649.

- Meza, M., Marín, J. C., Quintero, E. B., Colina, G., Rincón, N., Polo, C. A. (2013). Bioabsorción de Pb (II) Y Cr (III) usando la planta acuática *Pistia stratiotes*. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.*, 28 (3), 49-57.
- Miretzky, P., Saralegui, A., & Cirelli, A. F. (2004). Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*, 57(8), 997-1005.
- Miretzky, P., Saralegui, A., & Cirelli, A. F. (2006). Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere*, 62(2), 247-254.
- Mishra, S., Dwivedi, S. P., & Singh, R. B. (2010). A review on epigenetic effect of heavy metal carcinogens on human health. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3, 188-193.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S., & Gupta, D. K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65(6), 1027-1039.
- Mitchell, D. S., & Tur, N. M. (1975). The rate of growth of *Salvinia molesta* (*S. auriculata* Auct.) in laboratory and natural conditions. *Journal of Applied Ecology*, 213-225.

- Naja, G., Murphy, V., & Volesky, B. (2010). Biosorption, metals. Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, bioseparation, and cell technology. John Wiley & Sons, New York. 5248 p.
- Neustadt, J. & Pieczenik, S. (2007). Toxic-metal contamination: Mercury. *Integr. Med.*, 6, 36–37
- Ofomaja, A. E. (2007). Sorption dynamics and isotherm studies of methylene blue uptake on to palm kernel fibre. *Chemical Engineering Journal*, 126(1), 35-43.
- Ofomaja, A. E., Naidoo, E. B., & Modise, S. J. (2010). Dynamic studies and pseudo-second order modeling of copper (II) biosorption onto pine cone powder. *Desalination*, 251(1), 112-122.
- Olguín, E. J., Hernández, E., & Ramos, I. (2002). The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnologica*, 22(1-2), 121-131.
- Olguín, E. J., Sánchez-Galván, G., Pérez, T. & Pérez, A. (2005). Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb (II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 577-586.
- Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184(1-4), 105-126.

- Palacios, M., y Rico, V. (1992). *Salviniaceae*. Instituto de Ecología. Xalapa, México. University of California. 8 p.
- Paliulis, D. (2006). Numerical modeling of kinetics of heavy metal sorption from polluted water. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 14(1), 10-15.
- Paris, C., Hadad, H., Maine, M. A. y Suñe, A. N. (2005). Eficiencia de dos macrófitas flotantes libres en la absorción de metales pesados. *Limnetica*, 24(3-4), 237-244.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Anua. Rev. Plant Biol.*, 56, 15-39.
- Pilon-Smits, E. A., & LeDuc, D. L. (2009). Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 207-212.
- Polec, K., Ruzik, R., Lipiec, E., Ciużyńska, M., & Gawrońska, H. (2007). Investigation of Pb (II) binding to pectin in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22(8), 968-972.
- Pollard, A. J., Reeves, R. D., & Baker, A. J. (2014). Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science*, 217, 8-17.
- Prasad, M. N. V., & Freitas, H. M. (2003). Metal hyperaccumulation in plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3), 285-321.

- Pulford, I. D., & Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment International*, 29(4), 529-540.
- Rakhshaei, R., Giahi, M., & Pourahmad, A. (2009). Studying effect of cell wall's carboxyl-carboxylate ratio change of *Lemna minor* to remove heavy metals from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 165-173.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science*, 180(2), 169-181.
- Rodrigues, S. M., Henriques, B., Reis, A. T., Duarte, A. C., Pereira, E., & Römken, P. F. A. M. (2012). Hg transfer from contaminated soils to plants and animals. *Environmental chemistry letters*, 10(1), 61-67.
- Rosas, H. (2001). *Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat*. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, España. 330 p.
- Salem, H. M., Eweida, E. A., & Farag, A. (2000). Heavy metals in drinking water and their environmental impact on human health. ICEHM2000, Cairo University, Egypt, pp. 542-556.
- Samardakiewicz, S., & Woźny, A. (2000). The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. *Plant and Soil*, 226(1), 107-111.

- Sánchez-Galván, G. (2010). *Mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Pb²⁺ en *Salvinia minima**. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Xalapa, México. 129 p.
- Sánchez-Galván, G. y Olguín, E. J. (2009). A holistic approach to phytofiltration of heavy metals: recent advances in rhizofiltration, constructed wetlands, lagoons, and bioadsorbent-based systems. In: *Handbook of Advanced Industrial and Hazardous Wastes Treatment* (Ed: Wang, L. K., Hung, Y. T. & Shammas, N. K.). CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 389-408.
- Sánchez-Galván, G., Monroy, O., Gómez, J., & Olguín, E. J. (2008). Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors. *Water, Air, and Soil Pollution*, 194(1-4), 77-90.
- Sarma, H. (2011). Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(2), 118-138
- Schneider, I. A. H., & Rubio, J. (1999). Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. *Environmental Science & Technology*, 33(13), 2213-2217.
- Schneller, J. J. (1990). Salviniaceae. In: *Pteridophytes and Gymnosperms: Families and Genera of Vascular Plants* (Ed.: Kramer, K. U. & Green, P. S.). Springer Berlin Heidelberg. pp. 256-258

- Schnoor, J. L. (1996). *Environmental modeling: fate and transport of pollutants in water, air, and soil*. John Wiley and Sons. New York. 682 p.
- Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4), 523-544.
- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2009). Enhancement of nickel and lead accumulation and their toxic growth-inhibitory effects on amaranth seedlings in the presence of calcium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(1), 80-84.
- Seth, C. S., Remans, T., Keunen, E., Jozefczak, M., Gielen, H., Opdenakker, K., Weyens, N., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2012). Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 334-346.
- Sharma, P., & Pandey, S. (2014). Status of phytoremediation in world scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2(4), 178-191.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726.
- Song, H. M., Wang, H. Z., & Xu, X. B. (2012). Overexpression of *AtHsp90.3* in *Arabidopsis thaliana* impairs plant tolerance to heavy metal stress. *Biologia Plantarum*, 56(1), 197-199.

- Srivastav, R. K., Gupta, S. K., Nigam, K. D. P., & Vasudevan, P. (1993). Use of aquatic plants for the removal of heavy metals from wastewater. *International Journal of Environmental Studies*, 45(1), 43-50.
- Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación (SRIN). (2005). Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a plomo. Niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente. República Argentina. 51 p.
- Suñe, N., Sánchez-Galván, G., Caffaratti, S., & Maine, M. A. (2007). Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environmental Pollution*, 145(2), 467-473
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I. N., Maathuis, F. J. M., Sanders, D., Bouchez, D., & Fromm, H. (2000). Expression of a truncated tobacco *NtCBP4* channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb^{2+} tolerance. *The Plant Journal*, 24(4), 533-542.
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 1-31.
- Tariq, M., Ali, M., & Shah, Z. (2006). Characteristics of industrial effluents and their possible impacts on quality of underground water. *Soil Environ*, 25(1), 64-69.

- Thangavel, P., & Subbhuraam, C. V. (2004). Phytoextraction: Role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B*, 70(1), 109-130.
- Torres, G., Navarro, A. E., Languasco, J., Campos, K., & Cuizano, N. A. (2007). Estudio preliminar de la fitoremediación de cobre divalente mediante *Pistia stratiotes* (lechuga de agua). *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3 (1): 13-20.
- Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., & Maathuis, F. J. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology*, 25(4), 158-165.
- Uysal, Y., & Taner, F. (2009). Effect of pH, temperature, and lead concentration on the bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation*, 11(7), 591-608.
- Van der Ent, A., Baker, A. J., Reeves, R. D., Pollard, A. J., & Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant and Soil*, 362(1-2), 319-334.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D., Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(7), 765-794.

- Verma, R., & Suthar, S. (2015). Lead and cadmium removal from water using duckweed–*Lemna gibba* L.: Impact of pH and initial metal load. *Alexandria Engineering Journal*, 54(4), 1297-1304.
- Verma, S., & Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(4), 645-655.
- Villanueva, C. C. (2007). *Biosorción de cobre (II) por biomasa pretratada de cáscara de Citrus sinensis (naranja), Citrus limonium (limón) y Opuntia ficus (palmeta de nopal)*. Tesis de Grado. Lima, Perú. 74 p.
- Volesky, B. (1996). Biosorption: Application aspects-process simulation tools. *J. Chem Technol. Biotechnol.* 66 (1996) 355 – 364.
- Volesky, B. (1999). Biosorption for the next century. In: *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century - Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium* (Ed. Amils, R., & Ballester, A.). *Process Metallurgy*, 9, 161-170.
- Volesky, B. (2007). Biosorption and me. *Water research*, 41(18), 4017-4029.
- Wang, H., Shan, X., Liu, T., Xie, Y., Wen, B., Zhang, S., Han, F., & van Genuchten, M. T. (2007). Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots. *Planta*, 225(6), 1483-1494.

- Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 427-451.
- Wang, Q., Cui, Y., & Dong, Y. (2002). Phytoremediation of polluted waters potentials and prospects of wetland plants. *Acta Biotechnologica*, 22(1-2), 199-208.
- Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International scholarly research network ecology*, 1–20
- Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27(3), 715-721.
- Zubillaga, M. S. (2012). *Remediación de suelos forrajeros contaminados con metales pesados: impacto de la aplicación de residuos orgánicos y fitoextracción*. Tesis Doctoral. La Coruña, España. 159 p.