



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERIA DEL ROSARIO

MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y DESARROLLO SUSTENTABLE

**T E S I S**

FITORREMEDIACIÓN DE  $Pb^{2+}$  EMPLEANDO *Salvinia biloba* Raddi EN  
SISTEMAS ACUÁTICOS: EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD Y  
PERIODICIDAD DE LA DESCARGA CONTAMINANTE SOBRE LA  
EFICIENCIA DEL PROCESO Y LA FISIOLOGÍA VEGETAL

Para optar por el grado de

MAGISTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y DESARROLLO SUSTENTABLE

**P R E S E N T A**

Lic. KRISTEL CASTILLO LORÍA

DIRECTORES: Dra. MARÍA SOL HERRERO  
Dr. LEORNARDO MARTÍN PÉREZ

ROSARIO – ARGENTINA

**2017**

---

---

**DEDICATORIA**

A Dios y a mis padres, Mayela y Marco, por darme la vida y mostrarme su amor incondicional en cada momento y en cada detalle.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a la Pontificia Universidad Católica Argentina por aceptarme en su programa de Maestría en Ingeniería Ambiental y Desarrollo Sustentable, la cual me ha permitido adquirir nuevos saberes para trabajar en pos de un ambiente más sano y más justo.

A la Universidad de Costa Rica por el apoyo brindado para poder llevar a cabo este proceso de formación académica y personal.

Mi agradecimiento a los profesionales que trabajan en el Lab. de Biotecnología de Materiales y Medioambiente (Bio-TecMA), especialmente a mis directores, la Dra. María Sol Herrero y el Dr. Leonardo Martín Pérez, excelentes personas quienes me apoyaron y acompañaron compartiéndome de su talento y calidez humana; mostrándome en la labor de cada día elementos para mejorar en el mundo de la investigación.

Al Dr. Lucas Salvatierra por la oportunidad de integrarme a la línea de investigación en fitorremediación. A la Dra. Dana Loureiro y a la Lic. Daniela Bergara quienes me compartieron de su conocimiento y horas de trabajo. A Lucía Rodríguez, Laura Cardozo y Camila Olivera, compañeras de experiencias de aprendizaje. Muchas gracias a todos por brindarme su amistad y confianza.

A Saúl Moreano por apoyarme en la recolección de los especímenes de *Salvinia biloba* Raddi. A Marcelo Lamagni, Leandro Tur, Silvia Agesta, Ernesto Ezpeleta y compañeros de la maestría que tuve el privilegio de conocer y compartir tantos momentos que atesoraré por siempre.

A Ana Emilia Espinosa por todas las facilidades y acompañamiento que me brindó para ingresar a la maestría y alcanzar este logro.

A mis padres, hermanos, familiares y amistades quienes siempre han estado conmigo, a la distancia los he sentido muy cerca.

Finalmente, quiero agradecer a Dios, porque cada día de esta experiencia, me mostró que siempre está conmigo y entrega en mis manos una hermosa misión.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
I. INTRODUCCIÓN.....	1

1.1.	Problemática de los metales pesados.....	1
1.2.	Metales pesados.....	2
1.3.	Orígenes de la contaminación del recurso hídrico por metales pesados .....	3
1.4.	El plomo .....	6
1.4.1.	Características del plomo .....	6
1.4.2.	Toxicidad del plomo .....	7
1.4.3.	Normativa vigente respecto a la contaminación con plomo en la República Argentina .....	9
1.5.	La fitorremediación .....	11
1.6.	El concepto de planta hiperacumuladora .....	12
1.7.	Las plantas macrófitas .....	14
1.8.	Plantas acuáticas para remoción de contaminantes .....	15
1.9.	<i>Salvinia biloba</i> Raddi .....	16
1.10.	Clasificación taxonómica de <i>Salvinia biloba</i> Raddi .....	19
1.11.	Antecedentes del género <i>Salvinia</i> y fitorremediación .....	19
II.	OBJETIVOS.....	25
2.1.	Objetivo general.....	25
2.2.	Objetivos específicos .....	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1.	Obtención del material vegetal .....	26

3.2.	Preparación del material vegetal .....	26
3.3.	Soluciones de Pb <sup>2+</sup> .....	27
3.4.	Cuantificación de Pb <sup>2+</sup> en la columna de agua .....	28
3.5.	Determinación de parámetros fisiológicos asociados a la condición de toxicidad de la planta.....	28
3.5.1.	Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos ..	29
3.5.2.	Cuantificación de antocianinas .....	29
3.5.3.	Determinación de flavonoides .....	30
3.5.4.	Cuantificación de carbohidratos solubles .....	30
3.5.5.	Índice de estabilidad de la membrana .....	31
3.6.	Determinación de la capacidad fitorremediadora de <i>S. biloba</i> ante la descarga continua de Pb <sup>2+</sup> .....	31
3.7.	Determinación de la capacidad fitorremediadora de <i>S. biloba</i> ante la exposición continua a baja concentración de Pb <sup>2+</sup> durante un periodo prolongado .....	33
3.8.	Análisis estadístico .....	33
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1.	Evaluación de la eficiencia de remoción de Pb <sup>2+</sup> frente a descargas diarias con agua artificialmente contaminada .....	35
4.2.	Evaluación de la eficiencia de remoción de Pb <sup>2+</sup> frente a la descarga prolongada de agua contaminada con bajas concentraciones de metal .....	43
4.3.	Fitotoxicidad de Pb <sup>2+</sup> en <i>S. biloba</i> expuesta a la descarga continua de agua artificialmente contaminada.....	44

4.4.	Evaluación de parámetros fisiológicos en <i>S. biloba</i> luego de 10 días de exposición diaria a muestras de agua contaminada con Pb <sup>2+</sup> .....	48
	4.4.1. Pigmentos fotosintéticos .....	48
	4.4.2. Pigmentos antioxidantes .....	51
	4.4.3. Carbohidratos solubles .....	53
	4.4.4. Índice de estabilidad de la membrana .....	56
	4.5. Evaluación de parámetros fisiológicos en <i>S. biloba</i> luego de 44 días de exposición diaria a muestras de agua contaminada con Pb <sup>2+</sup> .....	58
V.	CONCLUSIONES.....	61
VI.	PROPUESTAS A FUTURO.....	62
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig .</b>	<b>Pág.</b>
1.1. Esquema de las vías de entrada y de los movimientos de los metales pesados en la atmósfera, suelo y agua.....	6
1.2. Concentración de metal en la biomasa de acuerdo a la capacidad de acumulación de metales pesados.....	14
1.3. Reresentación esquemática de <i>S. biloba</i> . a) aspecto de la planta; b) papilas con tricomas; c) papila con tricomas unidos	

en el extremo.....	18
1.4. Patrón de venación en frondas de <i>S. biloba</i> Raddi.....	19
4.1. Fotografías ilustrativas del sistema experimental por lotes utilizado en el presente estudio.....	35
4.2. Remoción de $Pb^{2+}$ por <i>S. biloba</i> expuesta a la descarga diaria de agua artificialmente contaminada con diferentes concentraciones de $Pb^{2+}$ .....	36
4.3. Comparación entre la cantidad (mg) de $Pb^{2+}$ removido por la biomasa de <i>S. biloba</i> frente a la cantidad total suministrada durante 10 días de descarga diaria con agua contaminada con diferentes concentraciones del metal.....	42
4.4. Variación en la capacidad de remoción de $Pb^{2+}$ por <i>S. biloba</i> frente a la exposición prolongada (44 días) a descargas diarias de agua contaminada con $1,88 \pm 0,15$ mg/L de metal.....	43
4.5. Fotografías ilustrativas de los cambios observados en la biomasa de <i>S. biloba</i> expuesta durante 10 días a descargas diarias de agua contaminada con diferentes concentraciones de $Pb^{2+}$ .....	45
4.6. Fotografía representativa que muestra el deterioro observado en Las papilas de la epidermis en frondas de <i>S. biloba</i> expuestas a $Pb^{2+}$ .....	46
4.7. Fotografías ilustrativas de los efectos fitotóxicos del $Pb^{2+}$ en la biomasa de <i>S. biloba</i> expuesta durante 44 días a descargas diarias de agua contaminada con $1,88 \pm 0,15$ mg/L del metal .....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág. pesados	.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
4.1.	Porcentaje de remoción de Pb <sup>2+</sup> de la columna de agua	por <i>S. biloba</i> luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones del metal.....	33
4.2.	Contenido de pigmentos fotosintéticos en frondas de <i>S. biloba</i> luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de Pb <sup>2+</sup> .....		45
4.3.	Contenido de pigmentos fotosintéticos en lacinias de <i>S. biloba</i> luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de Pb <sup>2+</sup> .....		45
4.4.	Contenido de pigmentos antioxidantes en frondas de <i>S. biloba</i> luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de Pb <sup>2+</sup> .....		47
4.5.	Contenido de pigmentos antioxidantes en lacinias de <i>S. biloba</i> luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de Pb <sup>2+</sup> .....		48
4.6.	Contenido de carbohidratos solubles en frondas y lacinias de <i>S. biloba</i> luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de Pb <sup>2+</sup> .....		50
4.7.	Índice de estabilidad de la membrana (%MSI) en frondas y lacinias de <i>S. biloba</i> luego de 10 días de descargas diarias a muestras de agua contaminada con diferentes concentraciones de Pb <sup>2+</sup> .....		52

---

4.8. Efecto de la exposición prolongada (44 días) a una descarga diaria con agua contaminada con 1,88 mg/L de Pb<sup>2+</sup> en los parámetros fisiológicos de *S. biloba*.....54

1.1. Principales actividades industriales generadoras de metales

## RESUMEN

En los últimos años, diversas tecnologías han sido desarrolladas con el fin de sanear aguas y suelos contaminados con diferentes sustancias. La fitorremediación empleando plantas acuáticas ha resultado ser una estrategia muy útil, demostrando enormes capacidades como herramienta sustentable para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados. Estudios previos con *Salvinia biloba* Raddi, una macrófita de flotación libre, autóctona y abundante en la República Argentina, han contribuido al entendimiento de los mecanismos que participan en la hiperacumulación de  $Pb^{2+}$  en dicha especie vegetal. El presente trabajo contribuye a profundizar el conocimiento de la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* bajo condiciones de estrés producto de la descarga diaria de agua contaminada con  $Pb^{2+}$ , y los efectos que dicha exposición aguda y prolongada causa sobre los parámetros fisiológicos de la planta. Para alcanzar estos objetivos, se evaluó la capacidad de remoción de  $Pb^{2+}$  en un periodo de 10 y 44 días, enfrentado diariamente a individuos de *S. biloba* a muestras de agua contaminada artificialmente con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$  ( $1,88 \pm 0,15$  mg/L;  $2,65 \pm 0,07$  mg/L;  $12,62 \pm 0,02$  mg/L y  $30,57 \pm 0,01$  mg/L). Se demostró la capacidad de *S. biloba* para mantener una elevada eficiencia de remoción bajo condiciones de estrés continuo, siendo ésta dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al metal. Los parámetros fisiológicos se vieron notablemente afectados, tanto a nivel de las raíces (lacinias) como de las hojas (frondas);

si bien, en general, el grado de deterioro de las raíces fue superior. Estos resultados sugieren la mayor implicancia de estos órganos en el proceso de remoción de  $\text{Pb}^{2+}$  por *S. biloba*.



---

## I. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. Problemática de los metales pesados.

A partir de la revolución industrial una serie de avances científicos y tecnológicos, han hecho posible el aumento en la capacidad del ser humano para explotar los bienes naturales. Sin embargo, esto ha generado una serie de perturbaciones a los ciclos biológicos, geológicos y químicos elementales **(Cañizares Villanueva, 2000)**. En este sentido, uno de los rasgos característicos de la sociedad moderna es la creciente emisión al ambiente de sustancias contaminantes **(Padmavathiamma y Li, 2007)**, superando muchas veces la capacidad de autodepuración de los ecosistemas receptores y provocando alteraciones en la calidad de los mismos **(Ronda, 2016)**.

Los ecosistemas acuáticos se utilizan directa o indirectamente como sumidero de líquidos y sólidos potencialmente tóxicos de origen doméstico, agrícola e industrial. Esta contaminación del bien natural, junto con la escases de recurso, la mala calidad del agua, y la falta de sistemas eficaces de saneamiento de aguas residuales, representan un grave problema de salud pública.

Al mismo tiempo compromete uno de los Objetivos del Desarrollo Sostenible (ODS) acordados por la Asamblea General de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el año 2015 de *asegurar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y saneamiento para todos*, que otorga al agua un carácter prioritario en todos los países miembros **(Cantú, 2016)**.

Por lo tanto, el tratamiento de las aguas residuales es un reto para la población comprometida con el Desarrollo Sostenible visto que la producción de efluentes contaminantes es una consecuencia inevitable de las actividades humanas.

En los últimos años se han implementado una serie de tecnologías de eliminación de iones metálicos en aguas residuales e industriales tales como: la precipitación química, tecnologías de filtración por membranas, extracciones orgánicas, intercambio iónico y procesos de adsorción, entre otros **(Ronda, 2016)**. Sin embargo, existen nuevas tecnologías, más económicas y sustentables, como la fitorremediación donde se utilizan plantas vasculares para eliminar sustancias contaminantes del suelo, lodos, sedimentos, agua, etc. Con el tiempo se han hecho más notables los beneficios de la fitorremediación para el saneamiento de aguas contaminadas con metales pesados por ser rentable, eficiente y amigable con el ambiente **(Dixit y col., 2015)**.

## **1.2. Metales pesados.**

Aunque no existe una definición del término metal pesado ampliamente aceptada por la comunidad científica **(Duffus, 2002)**, los términos “metales pesados” o “metales traza” son frecuentemente utilizados como sinónimo y son aplicados a un grupo de metales, y metaloides a los que se les asocia un importante potencial contaminante, alta toxicidad y ecotoxicidad, así como una elevada capacidad de acumularse en los organismos vivos que forman la cadena alimenticia.

También se le atribuye el término a aquellos elementos de carácter metálico con una densidad mayor a los 5 g.cm<sup>-3</sup>. La mayoría se encuentra

en la naturaleza como cationes a excepción de algunos metaloides, como el arsénico, los cuales se encuentran como aniones. **(Van der Perck, 2006).**

### **1.3. Orígenes de la contaminación del recurso hídrico por metales pesados.**

Los metales pesados presentes en los ecosistemas acuáticos tienen dos orígenes:

- 1) *Origen natural*: Sin duda la mayoría de los metales pesados se encuentran presentes de forma natural en la corteza terrestre. Se puede decir que del 90% de los elementos que se hallan en la superficie de la tierra, 60% son metales pesados **(Sharma y Dietz, 2006)**. Como resultado, la acción de los factores ambientales sobre los componentes de la corteza (roca, suelos) son determinantes en las concentraciones base de estos metales en los sistemas fluviales (aguas, sedimentos y biota). Así mismo, la concentración final en los recursos hídricos depende de factores como la composición fisicoquímica de los sedimentos, el tamaño y distribución de las partículas. La influencia de estos factores es tal, que una alta concentración de metales en los sedimentos puede deberse al material geológico presente sin que exista una fuente de contaminación de origen antropogénico **(Rosas Rodríguez, 2001)**.
- 2) *Origen antropogénico*: Es aquella causada por el hombre; es decir se entiende por contaminación de origen antropocéntrico la procedente de la intervención humana en el ciclo biogeoquímico de los metales pesados. Las fuentes antropogénicas de contaminación por metales

son muy diversas, y pueden derivar de actividades domésticas, comerciales e industriales (**Ronda, 2016**).

El problema de la contaminación del agua se ve directamente influenciado por las actividades industriales (Tabla 1.1), que introducen grandes cantidades de metales pesados potencialmente tóxicos a los sistemas acuáticos. Se estima que valores cercanos a los 109 kg/año de metales traza se depositan a la hidrosfera provenientes de diversas fuentes tales como aguas residuales domésticas, plantas térmicas, fundiciones y acerías (**El Mai, 2014**).

**Tabla 1.1.**

*Principales actividades industriales generadoras de metales pesados.*

<b>INDUSTRIA</b>	<b>METALES</b>	<b>PROCESO Y CONTAMINACIÓN DERIVADA</b>
Aleaciones y aceros	Te, Pb, Ni, Cu, Zn, Cd, As, Mo, U	Fabricación, eliminación y reciclaje de metales. Relaves y escoriales. Contaminación aguas y suelo.
Agricultura y Ganadería	Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn, As, Mn, Cu	Contaminación de escorrentía, aguas superficiales y subterráneas. Producción de agroquímicos. La bioacumulación vegetal y animal
Baterías	Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg	Fluido residual de la pila, la contaminación de aguas subterráneas y del suelo
Corrosión metálica	Fe, Pb, Ni, Co, Zn	Inestabilidad de los metales expuestos al medio ambiente
Electrónica	P, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn	Residuos metálicos acuosos y sólidos desde el proceso de fabricación y reciclaje. Contaminación atmosférica e hídrica
Extracción de minerales	As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Presencia en las menas como subproductos. Contaminación de las aguas superficiales, subterráneas, y del suelo
Fundición	Pb, As, Cd, Tl	Procesado de mineral para obtención de metales. Contaminación atmosférica. Residuos sólidos.
Galvanoplastia	Cr, Ni, Zn, Cu	Los efluentes líquidos de procesos de recubrimiento. Contaminación hídrica.

Gestión de residuos	Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg, Mn	Incineración de residuos o en lixiviados. Contaminación atmosférica de las aguas superficiales, subterráneas y del suelo
Hidrocarburos	As, Cu, Cr, Fe, Hg, Ni, Pb, Ag, Mn	Proceso de exploración, explotación y refinería generando contaminación de las aguas superficiales, subterráneas y del suelo.
Metalurgia	Cu, Cr, Mn Zn, P, S	Procesado térmico de metales. Contaminación atmosférica
Minería de metales ferrosos	Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn	Drenaje ácido de mina, relaves, escombreras, generación de lodos.
Pinturas y pigmentos	Pb, As, Cr, Zn, Ti, Ba	Residuos acuosos procedentes de la fabricación y el deterioro de la pintura vieja
Servicios y otras actividades	Cd, Cr, Hg, Ag, Pb, Zn, Sn, Fe, Ni, Mo, V, Mn, Co	Atención a servicios de salud. Pompas fúnebres y actividades relacionadas.

**Nota:** Adaptado de “Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales”, de. “Rubio y col., 2015. *Revista Revisión. Ingeniería y Región*, 13(1), 73-90.

Las vías de entrada de los metales a los ecosistemas se esquematizan en la Figura 1.1:



**Figura 1.1.** Esquema de las vías de entrada y de los movimientos de los metales pesados en la atmósfera, suelo y agua. Recuperado de “Preparación y aplicación

de biosorbentes activados químicamente para la eliminación de plomo de medios acuosos” de Ronda, A., 2016. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

#### **1.4. El plomo.**

El presente trabajo se ha centrado en el plomo debido a que las actividades industriales que lo generan son muy extensas y diversas. A continuación, se presentan las características fisicoquímicas de este elemento y las repercusiones en la salud de los seres vivos.

##### **1.4.1. Características del plomo.**

Existen en los sistemas biológicos metales pesados que pueden considerarse esenciales, son aquellos que son necesarios para la vida de los organismos en pequeñas cantidades debido a su participación en ciertas funciones fisiológicas, como por ejemplo el cinc (Zn) y el cobre (Cu) en el metabolismo de las microalgas (**Cordero y col., 2005**) y otros considerados como no esenciales, que no cumplen un rol bioquímico y/o fisiológico y, por lo tanto, no son necesarios para el desarrollo de los organismos vivos. El plomo no es necesario en ningún proceso biológico y por el contrario cuando las concentraciones dentro del organismos sobrepasan ciertos límites provocan efectos adversos e interfieren con el funcionamiento normal de los sistemas (**Ali y col., 2013**).

El plomo es un elemento metálico sólido a temperatura ambiente, con un aspecto gris azulado y se funde con facilidad. Sus valencias químicas son 2 y 4, es resistente al ataque de los ácidos clorhídrico y sulfúrico, pero se puede disolver lentamente en ácido nítrico. Se considera un elemento anfótero y es capaz de formar sales de plomo (**Ubillus, 2003**).

#### **1.4.2. Toxicidad del plomo.**

El plomo es un metal conocido en Egipto al menos 4000 años antes de Cristo. Sus aleaciones con antimonio y estaño se remontan a la antigüedad. Los efectos tóxicos de este metal han sido descritos hace más de 2000 años por Nicander, un poeta griego, quien escribió sobre una enfermedad conocida como plumbismo causada por una intoxicación aguda por plomo. Posteriormente, a la intoxicación por este metal se le llamó saturnismo, porque la alquimia consideraba al plomo como el origen de los demás metales. Por ello fue dedicado al dios Saturno, considerado en la mitología como el primero de los dioses. Desde la época romana, la clase dirigente padeció de saturnismo debido a la conservación de ciertos alimentos en recipientes de cobre recubiertos interiormente con planchas de plomo **(Graeme y Pollack, 1998; Rubio y col., 2004)**.

El plomo tiene la capacidad de bioacumularse en los tejidos vivos, por lo que su concentración en plantas y animales se magnifica a lo largo de la cadena trófica **(Halliwell y col., 2000)**. Así mismo, es uno de los metales que mayor efecto toxicológico tiene sobre los seres vivos, pues afecta fundamentalmente los procesos bioquímicos de prácticamente todas las células y sistemas del organismo. Este metal tiene la capacidad de interaccionar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, alterando su estructura y su función; o bien, de competir con los sitios de enlace de otros metales. El plomo es químicamente similar al calcio, por lo que tiene la particularidad de interferir con diversos procesos dependientes de éste **(Ali y col., 2013; Dixit y col., 2015)**.

En las plantas, aunque el plomo no es un elemento esencial, es fácilmente absorbido y acumulado en diferentes partes de la misma. La absorción de este metal está regulado por el pH, el tamaño de las partículas, y la capacidad de intercambio iónico con el sustrato, así como por otros parámetros físico-químicos. Entre los síntomas de toxicidad que provoca el exceso de plomo en las plantas se encuentran: la clorosis, la interrupción del crecimiento y el ennegrecimiento del sistema de raíces.

Por otro lado, el plomo inhibe la fotosíntesis, afecta el balance hídrico, la nutrición mineral, la estructura y permeabilidad de las membranas, entre otros **(Sharma y Dubey, 2005)**.

#### **1.4.3. Normativa vigente respecto a la contaminación con plomo en la República Argentina.**

En cuanto a la normativa vigente, el gobierno federal desarrolla toda una legislación en constante evolución para proteger la salud pública y la conservación de la calidad de los bienes naturales. Para el caso particular del plomo, en Argentina se tienen las siguientes:

**Ley N° 24.051 y el Decreto Reglamentario N° 831/93.** En esta ley se establecen los límites de plomo y sus compuestos para: emisiones líquidas, emisiones gaseosas desde superficie, emisiones gaseosas desde chimeneas, calidad de agua para protección de vida acuática (aguas saladas y salobres superficiales), calidad de agua para irrigación, calidad de agua para bebida de ganado, calidad de agua para bebida humana, calidad de suelos para uso agrícola, calidad de suelos para uso residencial, calidad de suelos para uso industrial,

calidad de aire ambiental y barros para relleno sanitario. En lo que concierne al agua, menciona que las fuentes de agua con tratamiento convencional destinadas a consumo humano no deben superar los 5 µg/L de plomo, y en el Anexo VI de este mismo decreto se establece el límite para los parámetros químicos que deben cumplir los barros destinados a relleno sanitario el cual admite hasta 1 mg/L.

**Resolución N° 1089/82** DIRECCION PROVINCIAL DE OBRAS

SANITARIAS SANTA FE. Reglamenta el control de vertido de líquidos residuales establece las condiciones a las cuales deberá ajustarse un efluente considerando las características y la capacidad de dilución del cuerpo receptor.

**Resolución N° 242/93** de la ex-SECRETARIA DE RECURSOS NATURALES Y AMBIENTE HUMANO. Establece el límite de contaminación tolerado para plomo en vertidos industriales o especiales.

**Decreto N° 2121/90** prohíbe totalmente el uso de arseniato de plomo como fitosanitario.

**Resolución N° 54/96** de la ex-SECRETARIA DE OBRAS Y SERVICIOS PUBLICOS establece que se elimine el plomo de las naftas.

**Disposición N° 1110/99** de la ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA (ANMAT)

establece normas que debe cumplir el rotulado de tinturas capilares con acetato de plomo.

**Ley N° 18.284** (CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO) y sus **Decretos Reglamentarios N° 2126/71 y Decreto N° 815/99** prohíben el uso de plomo en pintura, decorado y esmaltado de los envases, y en los barnices para la protección interna de los depósitos de agua de bebida, y establecen límites máximos de plomo en alimentos, en papeles, cartulinas y cartones.

**Resolución N° 425/97** de la SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION, establece límites de plomo para moluscos bivalvos destinados a consumo humano.

**Resolución N° 18/97** del INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA modifica el límite máximo de plomo, para liberación al consumo de todos los vinos de cosecha 1997 y posteriores.

**Resolución N° 444/91** del ex-MINISTERIO DE TRABAJO Y SEGURIDAD SOCIAL establece las Concentraciones Máximas Permisibles de plomo inorgánico, tetraetilo y tetrametilo en ambiente laboral.

**Ley N° 24.557** (de Enfermedades Profesionales) y Decreto **Reglamentario N° 658/ 96** establece los criterios diagnósticos de la intoxicación con plomo como enfermedad profesional, según se trate

de plomo inorgánico o compuestos alquílicos todo esto salió del reglamento para pinturas.

### **1.5. La fitorremediación.**

Cabe aclarar que el concepto de fitorremediación no es nuevo, desde hace 300 años las plantas han sido propuestas para el tratamiento de aguas residuales (**Ernst, 2000**). La fitorremediación consiste en un conjunto de tecnologías que reducen, ya sea *in situ* o *ex situ*, la concentración de diversos compuestos a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas (**Delgadillo y col., 2011**).

Dicho de otra manera 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; y donde la degradación de algunos de estos compuestos puede verse acelerada mediante la acción de ciertos microorganismos. Entre los compuestos que pueden eliminarse a través de esta tecnología se encuentran los radionúclidos, contaminantes orgánicos e inorgánicos (**Pilon-Smits, 2005; Ali y col., 2013; Dhir, y Srivastava, 2013; Dixit y col., 2015**).

La fitorremediación se basa en tecnologías que han mostrado ser competitivas al compararse con muchos métodos convencionales, especialmente para remover metales en bajas concentraciones. Al mismo tiempo, una de sus mayores ventajas es que las plantas pueden utilizarse en sistemas de extracción de bajo costo, lo cual representa una solución apropiada para remediar áreas extensas (**Sharma y Pandey, 2014**).

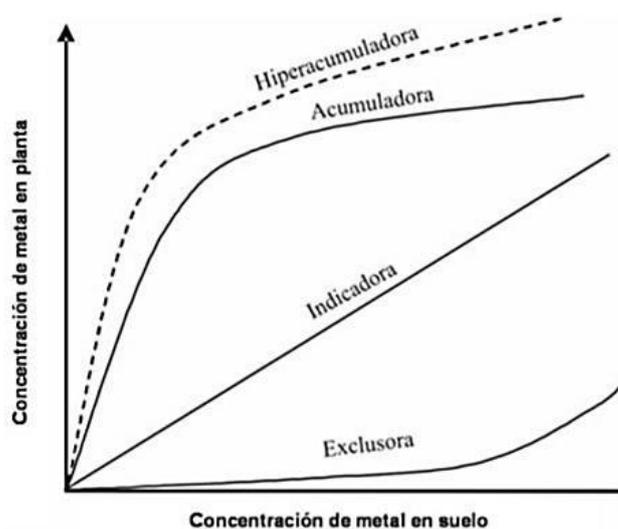
## **1.6. El concepto de planta hiperacumuladora.**

Unido al concepto de fitorremediación se encuentra el de planta hiperacumuladora. En los últimos años ha aumentado el interés por las plantas que pueden acumular y tolerar cantidades inusualmente altas de metales en sus tejidos. Debe aclararse primeramente que todas las plantas poseen un potencial para absorber una amplia variedad de metales del ambiente en el que habitan, donde, la mayoría de las plantas tienden a absorber aquellos metales que son esenciales para su supervivencia y desarrollo. Sin embargo, existe un pequeño grupo de plantas que pueden tolerar, absorber y translocar altos niveles de ciertos metales, estas plantas reciben el nombre de hiperacumuladoras **(Chen y col., 2001)**.

En efecto, la resistencia se basa en dos estrategias diferentes: una eficiente exclusión del metal restringiendo su transporte a la parte aérea; o bien a través de acumular el metal en la parte aérea, en una forma no tóxica para la planta. Tal parece la exclusión es más característica de especies sensibles y tolerantes a los metales, mientras que la acumulación es más común de especies que aparecen siempre en ambientes contaminados o metalíferos **(Llugany y col., 2007)**.

No obstante, las plantas acumuladoras, a diferencia de las tolerantes excluyentes, absorben los metales activamente desde el sustrato y lo acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea. Entre las plantas acumuladoras se reconocen diversos grados de acumulación, desde pequeñas elevaciones sobre el nivel de fondo hasta concentraciones excesivamente elevadas. Para determinar si una planta es acumuladora se utiliza el "*factor de bioconcentración*" (*FBC*), definido como el cociente entre la concentración de un metal en la planta y la concentración del mismo en

el sustrato (**McGrath y Zhao, 2003**). Un FBC $>1$  indica que una planta es acumuladora. La capacidad de acumular grandes cantidades de metales se denomina hiperacumulación (Figura 1.2). Por tanto, se concluye que una planta hiperacumuladora se define como aquella planta metalófila que puede acumular concentraciones de metales pesados de 1000 ppm para Ni, Co, Cu, Cr y Pb y de 10.000 ppm para Zn. También existen aquellas que acumulan en forma proporcional a la concentración de metal en el sustrato, denominadas indicadoras (**González, 2016**).



**Figura 1.2.** Concentración de metal en la biomasa de acuerdo a la capacidad de acumulación de metales pesados. Recuperado de “Mejoramiento de la fitoextracción en plantas nativas en suelos contaminados por actividades mineras en Puchuncaví y Quintero” de González, M. I., 2016, Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.

### 1.7. Las plantas macrófitas.

La fitorremediación con plantas acuáticas, también conocidas como macrófitas, ha sido ampliamente utilizada. Las macrófitas están representadas por toda la vegetación que crece en la zona litoral de lagos, embalses y ríos, ya sea en la zona de interface agua-tierra (emergentes), sobre la superficie de agua (flotantes) o totalmente sumergida (sumergidas).

Su dominancia invasiva en los ecosistemas acuáticos es consecuencia del éxito adaptativo que les confiere su plasticidad fenotípica que, igualmente, puede ser potenciada con la oferta de recursos en ecosistemas acuáticos alterados por el hombre **(Rial, 2013)**. Las macrófitas enraizadas o emergentes toman los nutrientes de los sedimentos o del agua intersticial de estos, pero las flotantes los toman simplemente del agua.

Las macrófitas están abundantemente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales, por lo que representan una herramienta adecuada para el tratamiento de agua contaminada con metales en las zonas donde se desarrollan.

### **1.8. Plantas acuáticas para remoción de contaminantes.**

Debido a la habilidad que tienen las macrófitas acuáticas para asimilar, hasta cierto punto, diferentes compuestos presentes en el agua considerados contaminantes, las mismas se han empleado en la detección y remoción de sustancias en efluentes de aguas residuales, domésticas e industriales **(Bolaños y col., 2008)**. La importancia de las macrófitas radica en su facilidad para ser empleadas en núcleos rurales debido a su bajo consumo de energía convencional y a la practicidad en el montaje y operación de los sistemas de tratamiento. Aun así, todavía no se han esclarecido rigurosamente los procesos que tienen lugar en la depuración de aguas residuales con macrófitas flotantes **(Martelo y Lara, 2012)**.

### **1.9. *Salvinia biloba* Raddi.**

Dentro de las numerosas especies vegetales estudiadas en sistemas acuáticos por su capacidad fitorremediadora de metales pesados se

encuentran los helechos acuáticos del género *Salvinia*. Este género integra unas 10 especies de macrófitas de flotación libre, herbáceas y sin raíces.

En Argentina, es posible encontrar 4 especies del género: *Salvinia minima* Baker, *Salvinia adnata*, *Salvinia auriculata* Aublet y *Salvinia biloba* Raddi (también conocida como *Salvinia herzogii*) **(Martínez y Cacharani, 2011)**.

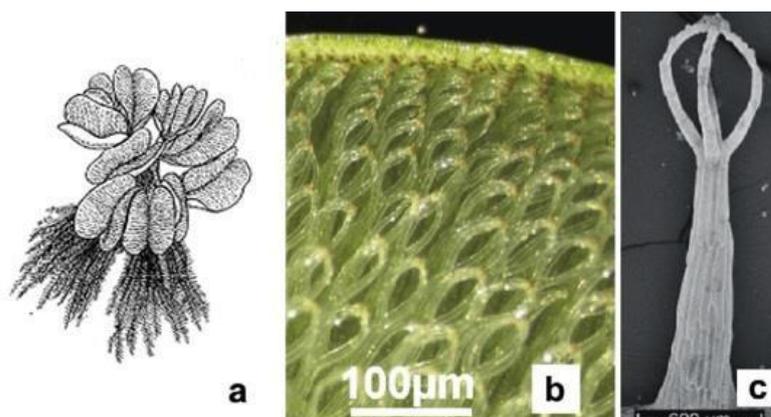
Las salvinias son pequeñas pteridófitas que flotan libremente en aguas tranquilas, cubriéndolas por completo si las condiciones de vida son favorables. Estructuralmente consisten en un tallo rizomatoso (tallo de crecimiento horizontal del que surgen los brotes) tendido en la superficie del agua, poco dividido, en el que de cada nudo surgen tres frondas. Dos son superiores, flotantes plegadas sobre sí mismas por una nervadura central; y una tercera inferior sumergida, desprovista de lámina cuyas nervaduras forman lacinias filiformes (con apariencia de hilo) cubiertas de tricomas que hacen la función de raíces, de las cuales carece la planta (Figura 1.2 a). Aunque el aspecto exterior aparenta un manojito de raíces, la estructura de tricomas en lugar de pelos radicales, y la capacidad de producir esporocarpios (estructuras reproductivas) lo descartan **(De la Sota, 1939)**.

*S. biloba*, conocida como “acordeón de agua” se ubica morfológicamente dentro del complejo *S. auriculada*. Este grupo está integrado por las especies *S. auriculata* Aublet, *S. molesae* D.S. Mitchel, *S. biloba* Raddi (también conocida como *S. herzogii* de la Sota) **(Salas y Quintana, 2016)**. Los individuos de este grupo se caracterizan además por poseer esporocarpos subglobosos o elipsoidales, con un soro en el que pueden encontrarse megasporangios y/o microsporangios **(Paiva, 1986; Cirujano y col., 2014)**, y por el hecho de poseer papilas con 4 pelos unidos en sus extremos que dan lugar a una estructura muy

característica semejante a la de un batidor de huevos (Figura 1.2 b,c).

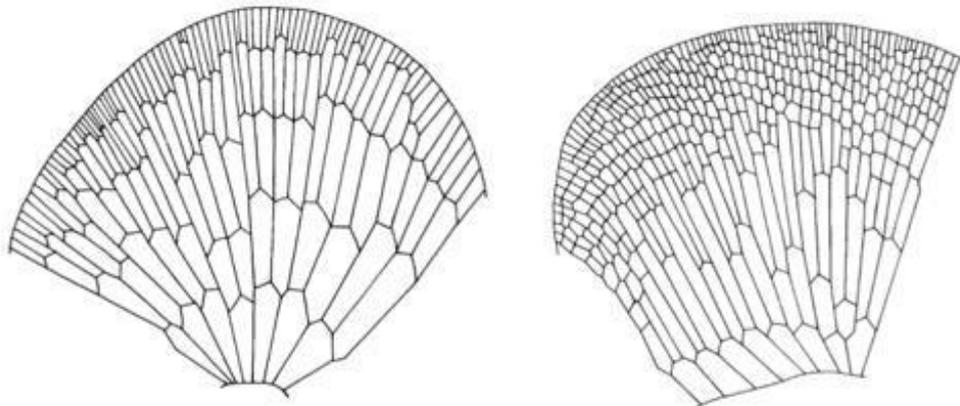
Concretamente *S. biloba* se caracteriza estructuralmente hablando por la presencia de rizomas de 2mm de diámetro con disposición de tejido vascular tipo solenostela en U. Las láminas foliares de plantas fértiles son bilobadas, plegadas, sésiles o con pecioloos breves de hasta 30 x 45 mm.

En ambas epidermis se presentan células de contorno de tipo ameboidal. El órgano sumergido presenta un eje primario bien desarrollado y robusto de 10mm de largo o más. Los ejes secundarios son cortos, dicótomos, no curvados. Los ejes reproductivos se encuentran en número de 1-3, con dos dicotomías terminadas en megasporocarpos y una cima helicoide a pseudoescorpioide con más de 10 microsporocarpos densamente dispuestos. Dos megasporocarpos globosos, apiculados con placentas poco ramificadas. Microporocarpos ovoideos, apiculados, de 2,5-3 x 1.5 mm con placentas detriticas o dicotómicamente ramificadas. **(De la Sota, 1995).**



**Figura 1.3.** Representación esquemática de *S. biloba*. a) aspecto de la planta; b) papilas con tricomas; c) papila con tricomas unidos en el extremo. Adaptado de “Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics” de Koch y col.,2009. *Prog. Mater. Sci.* 54, 137-178 y de “Salviniaceae. Aportes Botánicos de Salta” de “Martínez y Cacharani, 2011., *Serie Flora*, 11(1): 1-7.

Desde el punto de vista de la descripción vegetativa, los individuos de *S. biloba* presentan areolas en las frondas que no son de igual longitud en los márgenes que en las dos terceras partes del lóbulo de la lámina. También se puede dar que, las areolas son mucho más largas que anchas (la proporción es de 1:6 aproximadamente), e igual en todas las areolas. Se puede presentar areolas no mucho más largas que anchas (la proporción es de 1:3 o menor) siendo esta proporción mayor en las areolas cercanas a la quilla y menor en las cercanas al margen de la hoja (Figura 1.3) (Forno, 1983; Salas y Quintana, 2016).



**Figura 1.4.** Patrón de venación en frondas de *S. biloba* Raddi. Adaptado de “Native distribution of the *Salvinia auriculata* complex and keys to species identification” de Forno, 1983. *Aquatic Botany*. 17(1):71-83.

#### 1.10. Clasificación taxonómica de *Salvinia biloba* Raddi.

Reino: Plantae

División: Pteridophyta

Clase: Polypodiopsida

Orden: Salviniales

Familia: Salviniaceae

Género : *Salvinia*

Especie: *biloba*

Nombre científico: *Salvinia biloba* Raddi

Sinonimia: *Salvinia herzogii* De la Sota

Nombre común: Acordeón de agua

### **1.11. Antecedentes del género *Salvinia* y fitorremediación.**

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 (**Dhir, 2009**).

**Gardner y Al-Hamdani (1997)** llevaron a cabo una investigación con *S. minima* y demostraron la habilidad de la especie para resistir la presencia de aluminio (Al), aún a concentraciones de 20 mg/L en una evaluación llevada a cabo en 24 horas con manipulación del pH. Esta capacidad no se limitó solo al aluminio, **Olguín y col. (2002)** demostraron la considerable habilidad de la especie para acumular Cd(II) en una proporción de 10,930 mg/kg, con lo que los autores concluyen que se puede considerar una especie hiperacumuladora.

**Nichols y col. (2000)** señalaron que este grupo de plantas tiene la capacidad de duplicar su población en aproximadamente 3,5 días, característica muy adecuada para los procesos de fitorremediación. Los autores además evaluaron el impacto del cobre, a concentraciones desde

0,06 (control) hasta 3,0 mg/L, sobre algunos parámetros fisiológicos como los pigmentos fotosintéticos y la asimilación de CO<sub>2</sub>.

Recientemente **Kumari y col. (2016)** pusieron a prueba tres especies de *Salvinia*: *S. natans*, *S. molesta* y *S. auriculata* en la que evaluaron los efectos de los metales pesados sobre parámetros fisiológicos como crecimiento, y la acumulación de los mismos en los tejidos en un periodo de 10 días. Se obtuvo que la exposición a los metales pesados Cd Cr, Hg y Zn disminuyeron la masa de la planta, en peso fresco, conforme se aumentó la concentración de los metales. Además, las tres especies mostraron una acumulación representativa de los metales en sus tejidos.

Específicamente centrándose en estudios llevados a cabo con Pb<sup>2+</sup> por **Olguín y col. (2002)**, evaluaron la capacidad de *S. minima* para bioacumular y el efecto del pH y la intensidad de la luz en el proceso; obtuvieron que el porcentaje de Pb<sup>2+</sup> en la biomasa fue de 1,1%, mostrando la capacidad hiperacumuladora de esta planta para el metal. Posteriormente, **Olguín y col. (2005)** estudiaron los efectos de los factores ambientales y nutrientes sobre los mecanismos de eliminación y la compartimentación en sistemas operados por lotes, y obtuvieron que la adsorción a la superficie es el mecanismo predominante.

**Sánchez Galván y col. (2008)** investigaron algunas características fisicoquímicas de *S. minima* que participan en la hiperacumulación entre ellas el área superficial y el contenido de grupo carboxilos. Obtuvo valores de área superficial de 264 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> y el contenido de grupos carboxilo de 0,95 mmol/H<sup>+</sup>, dos de las más importantes en la acumulación de metales) además basado en un análisis de compartimentalización, se propusieron dos factores novedosos: el factor de adsorción (FAD) y el factor de

acumulación intracelular (FAI), para obtener un mayor entendimiento sobre la hiperacumulación de  $Pb^{2+}$  en la planta.

No obstante, aunque el género *Salvinia* ha sido ampliamente estudiado, pocos estudios se han concretado en Argentina con las especies autóctonas que crecen bajo condiciones locales. A continuación, se detallan algunos antecedentes:

**Paris y col. (2005)** estudiaron la eficiencia en la absorción de metales pesados de dos macrófitas flotantes que habitan naturalmente en el valle de inundación del río Paraná medio: *S. herzogii* de la Sota y *Pistia stratiotes*. Se evaluaron tres metales pesados Cr, Cd y  $Pb^{2+}$  en forma independiente y como mezcla conjunta. Se midieron las concentraciones remanentes de los metales en el agua en función del tiempo y su contenido en los tejidos vegetales. Como resultado de estas experiencias, los autores concluyeron que la absorción se produjo mayoritariamente en las primeras 24 h y que *S. herzogii* presentó un porcentaje de bioacumulación total de los metales superior al obtenido para *P. stratiotes*.

**Suñé y col. (2007)** continuaron las investigaciones con estas dos macrófitas acuáticas analizando la sorción de Cr y Cd a concentraciones de 6 mg/L. Nuevamente, sus resultados demostraron que el género *Salvinia* alcanza valores de remoción superiores que *P. stratiotes*. En concordancia con otros reportes previos, se concluye que en ambas especies vegetales la remoción de los metales se produce fundamentalmente en las primeras 24 horas.

Más recientemente, **Prado y col. (2016)** evaluaron la capacidad para eliminar Cr(VI) en dos concentraciones (5 y 20 mg/L) de dos especies del género *Salvinia*: (*S. minima* y *S. rotundifolia*) obtenidas de un acuario local.

Los autores evaluaron los cambios producidos en la biomasa, cantidad de pigmentos fotosintéticos, porcentaje de acumulación de Cr(VI), peroxidación lipídica, contenidos de tioles y compuestos fenólicos, e índice de estabilidad de la membrana. Como resultado se obtuvo que *S. minima* fue la más afectada en el crecimiento de la biomasa. Así mismo, la acumulación del metal fue diferente entre las especies. Se observó que *S. minima* acumuló más metal en las frondas mientras que *S. rotundifolia* lo hizo en lacinias. Finalmente, el contenido de tioles y compuestos fenólicos en frondas y lacinias mostró diferentes patrones de distribución en ambas especies.

**Tello Zevallos y col. (2015)**, en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina), llevaron a cabo una investigación con *S. biloba* una especie local que mostró facilidades para sobrevivir en condiciones experimentales. En el trabajo, evaluaron la capacidad de *S. biloba* para eliminar  $Pb^{2+}$  en muestras acuosas contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones iniciales del metal (5, 10 y 20 mg/L) y a distintos tiempos de exposición (0; 0,5; 2; 4; 6; 12 y 24 h). Determinaron los parámetros *factor de bioconcentración* (FBC), *factor de adsorción* (FAD) y *factor de acumulación intracelular* (FAI), con el fin de evaluar la eficiencia en la eliminación del metal y la capacidad para hiperacumular  $Pb^{2+}$  por parte de la planta. Como resultado, concluyeron que *S. biloba*, al igual que otras especies estudiadas de este género en el país, mostró una gran capacidad para eliminar  $Pb^{2+}$  alcanzando, en tan sólo 24 h, más del 90% de remoción del metal presente en las muestras de agua. A partir de los valores hallados para el FBC, así como de FAD y FAI, se concluyeron además que *S. biloba* puede definirse como una especie vegetal hiperacumuladora de  $Pb^{2+}$  donde la adsorción es el principal mecanismo involucrado en la eliminación de este contaminante.

Los excelentes resultados obtenidos en esta investigación abrieron nuevas preguntas, especialmente referidas a la capacidad de esta especie vegetal para mantener la elevada tasa de remoción de  $Pb^{2+}$ , aún sujeta al estrés por la exposición prolongada y repetida al metal. Además, las repercusiones que dicho estrés toxicológico es capaz de producir sobre algunos aspectos fisiológicos de la planta.

Lo anteriormente expuesto orientó los objetivos de la presente investigación, donde principalmente se pretende simular una situación de cuerpos de agua receptores expuestos a la descarga continua de contaminantes, con el fin de estudiar la respuesta de las macrófitas seleccionadas frente a estas condiciones y su posible aplicación en el saneamiento de aguas contaminadas.

## **II. OBJETIVOS**

---

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la capacidad de *S. biloba* para eliminar  $Pb^{2+}$  en soluciones acuosas artificialmente contaminadas, bajo condiciones de estrés provocadas por la exposición continua al metal, en diferentes concentraciones, y a diferentes períodos de exposición.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- 1- Cuantificar la capacidad de remoción diaria de  $Pb^{2+}$  en sistemas en *batch* operados con *S. biloba* para diferentes concentraciones del metal suministradas consecutivamente cada 24 h.
  
- 2- Analizar y evaluar los cambios fenotípicos relacionados con la salud de las plantas luego de la exposición diaria, y por diferentes períodos de tiempo, a distintas concentraciones de  $Pb^{2+}$ .
  
- 3- Cuantificar el grado de daño a los órganos vegetales producido por la fitotoxicidad del  $Pb^{2+}$  mediante la cuantificación de parámetros bioquímicos y fisiológicos, tales como el índice de estabilidad de membrana, el contenido de carbohidratos solubles, y la concentración de pigmentos fotosintéticos y antioxidantes.

## III. METODOLOGÍA

---

### 3.1. Obtención del material vegetal.

Los especímenes de *S. biloba* utilizados en la presente investigación se obtuvieron del parador conocido como “Isla Verde” localizado en las coordenadas geográficas (latitud 32°52’35” Sur y longitud 60°40’33” Oeste) entre la playa de la Florida y la cabecera del puente RosarioVictoria, en analogía con las muestras de material vegetal utilizadas en investigaciones previas del grupo (**Tello Zevallos y col., 2015**). Los mismos se colectaron a orillas de la laguna, en un recipiente plástico, junto con agua del sitio

para mantener las características de su ambiente. Es interesante remarcar que las condiciones de la laguna donde se colectaron las plantas, permiten un adecuado crecimiento de estas macrófitas en el ecosistema. En los márgenes del río Paraná las fluctuaciones en el nivel del agua y el caudal habitual del mismo dificultarían su colonización.

Posteriormente, los especímenes se trasladaron a la planta piloto de la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA) para ser conservados a temperatura ambiente en peceras de vidrio con una combinación de agua potable municipal y agua de la laguna.

### **3.2. Preparación del material vegetal.**

Previo al pesado de la biomasa para llevar a cabo los experimentos de remediación, fue necesario hacer un lavado de los especímenes de *S. biloba* con la finalidad de remover cualquier residuo contaminante que pudiera interferir con el estudio (**Torres y col., 2007**). El lavado se realizó con abundante agua corriente por alrededor de 10 min. Este procedimiento se realizó tomando en cuenta la fragilidad del material, para ello las plantas se colocaron en una bandeja plástica llena de agua cubiertas con un colador que impidiera que éstas fueran arrastradas por el agua saliente pero que también permitiera que el agua circulara por el tejido arrastrando las partículas y residuos adheridos al material. La cantidad de biomasa húmeda utilizada en cada unidad experimental fue aproximadamente de 10,0 g. Para ello, inicialmente se colocaron las plantas en un colador para escurrir el excedente de agua y se las dejó reposar por 5 min.

Posteriormente, se procedió a pesar la cantidad mencionada utilizando una balanza analítica.

### **3.3. Soluciones de Pb<sup>2+</sup>.**

Para obtener las diferentes concentraciones de Pb<sup>2+</sup> a ensayar se realizaron diluciones adecuadas a partir de una solución madre de 1000 mg/L, que se preparó disolviendo Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> comercial de grado analítico en agua destilada. En la investigación se emplearon diluciones de Pb<sup>2+</sup>: en las siguientes concentraciones: 1,88±0,15 mg/L; 2,65± 0,07 mg/L; 12,62±0,02 mg/L y 30,57±0,01 mg/L.

### **3.4. Cuantificación de Pb<sup>2+</sup> en la columna de agua.**

La determinación de la concentración residual de Pb<sup>2+</sup> en la columna de agua se realizó por espectroscopia de absorción atómica empleando un equipo Varian AA240FS (Varian Inc. Palo Alto, CA, EEUU) instalado en la Fac. de Química e Ingeniería (UCA-Rosario)- según el procedimiento descrito en las normas APHA (1998). Para llevar a cabo estas mediciones, previamente se realizó una curva de calibración con soluciones patrones de Pb<sup>2+</sup> de concentración conocida preparadas en agua acidulada (HNO<sub>3</sub> cc. 0,15%).

### **3.5. Determinación de parámetros fisiológicos asociados a la condición de toxicidad de la planta.**

Para determinar los efectos sobre la salud de la planta producto de la exposición continua al Pb<sup>2+</sup> se llevó a cabo, al final de cada ensayo, una

evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos, antocianinas, flavonoides, carbohidratos solubles e índice de estabilidad de la membrana.

Para ello, se lavó la biomasa con agua ultra pura y se colocó sobre papel absorbente con la finalidad de eliminar el exceso de humedad en la parte externa del tejido. Luego, se procedió con las diferentes determinaciones. Para todos los procesos que se describen a continuación se evaluaron por separado frondas y lacinias.

### **3.5.1. Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos.**

La cuantificación de clorofilas (clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila total) y carotenoides se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por **Leal y col. (2016)** con algunas modificaciones. Brevemente, se tomó 50 mg de biomasa y se trituró hasta alcanzar pequeños trozos que fueron colocados en tubos de ensayo. Al material previamente triturado se le agregó 4,5 ml de acetona al 80%. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en oscuridad por 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron por 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 470, 646 y 663 nm con un espectrofotómetro de UV/visible Lambda 25 (Fac. de Química e Ingeniería, UCA-Rosario).

El contenido de pigmentos se calculó mediante las ecuaciones propuestas por **Wellburn (1994)**:

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g/mL}) = 12.21(A_{663}) - 2.81(A_{646})$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g/mL}) = 20.13(A_{646}) - 5.03(A_{663})$$

$$\text{Chl}_{total} (\mu\text{g}/\text{mL}) = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g}/\text{mL}) = [(1000A_{470} - 3.27[\text{Chl}_a]) - 104[\text{Chl}_b]]/198$$

### **3.5.2. Cuantificación de antocianinas.**

Se efectuó según el procedimiento propuesto por **Bizzo y col. (2014)** con leves modificaciones. Se tomó 50 mg de biomasa y se la trituro hasta alcanzar pequeños trozos que fueron colocados en tubos de ensayo.

Al material triturado se le agregó 5 mL de una solución de metanol y ácido clorhídrico 99:1 (v/v). Posteriormente, cada tubo de ensayo se mantuvo en oscuridad por 24 h. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron durante 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 550 nm. Para el cálculo de la concentración de antocianinas se utilizó el coeficiente de extinción  $33.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.5.3. Determinación de flavonoides.**

La determinación de flavonoides se llevó a cabo según el procedimiento propuesto por **Bizzo y col. (2014)** con algunas modificaciones. Se tomó 50 mg de biomasa triturada y se mezcló con 5 mL de una solución de etanol y ácido acético 99:1 (v/v). Posteriormente, las muestras se hirvieron por 10 min a baño maría (80°C). Una vez a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 270, 300 y 330 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis.

### **3.5.4. Cuantificación de carbohidratos solubles.**

Se utilizó el método propuesto por **Bizzo y col. (2014)** con leves modificaciones. Se tomó 100 mg de biomasa triturada y se mezcló con 2 mL de metanol (80%). Luego, las muestras tratadas se calentaron a 70°C por 30 min. Una vez a temperatura ambiente, 1 mL del extracto se mezcló con 1 mL de fenol (5%) y 5 ml de ácido sulfúrico (95%). Posteriormente, la mezcla se dejó reposar por 1 h a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de la muestra a 640 nm empleando un espectrofotómetro

UV/Vis. Se utilizó Glucosa como estándar.

### **3.5.5. Índice de estabilidad de membrana.**

El índice de estabilidad de membrana (MSI) se evaluó a partir de mediciones de conductividad eléctrica de acuerdo al protocolo descrito por **Prado y col. (2016)** con algunas modificaciones. Concluido el periodo de exposición al  $Pb^{2+}$ , 50 mg de biomasa se colocaron en tubos de ensayo con 10 mL de agua destilada. Luego, se incubaron a 40°C por 30 min y, una vez alcanzada la temperatura ambiente, se midió la conductividad eléctrica (E1) de las muestras utilizando un conductímetro EC215.

Inmediatamente obtenido este valor, los tubos se llevaron a baño maría (90°C) por 15 min. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se midió nuevamente la conductividad eléctrica (E2) y se calculó el MSI (%) aplicando la siguiente ecuación:

$$MSI (\%) = (1 - (E1/E2) \times 100)$$

### **3.6. Determinación de la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* ante la descarga continua de $Pb^{2+}$ .**

La capacidad de *S. biloba* para remover  $Pb^{2+}$  en muestras de agua contaminadas artificialmente se evaluó utilizando cuatro concentraciones del metal ( $1,88 \pm 0,15$  mg/L;  $2,65 \pm 0,07$  mg/L;  $12,62 \pm 0,02$  mg/L y  $30,57 \pm 0,01$  mg/L).

Cada concentración fue considerada como un tratamiento. El periodo de evaluación para todos los grupos experimentales fue de 10 días. En cada tratamiento se utilizaron 4 unidades experimentales compuestas por 10 g de biomasa húmeda y 400 mL de solución en un vaso de precipitado de 600 mL. En cada tratamiento, una unidad experimental se etiquetó como “Control”, donde se colocó la biomasa en agua ultra pura (sin adición de  $Pb^{2+}$ ). En las tres unidades restantes (A, B, C) se colocó el metal en las concentraciones de ensayo y fueron réplicas entre sí ( $n=3$ ).

El primer día (día 0) las 3 unidades experimentales (A, B, C) fueron expuestas a la concentración de  $Pb^{2+}$  a evaluar, y la unidad “Control” a agua ultra pura. Cada 24 h, durante los 10 días de duración del ensayo, se tomó la biomasa contenida en las unidades experimentales con un colador, se dejó escurrir el excedente de líquido y se trasvasó a un nuevo vaso de precipitado con 400 ml de solución (agua ultra pura para el caso del grupo “Control” y solución de  $Pb^{2+}$  a la misma concentración inicial del Día 0 para los tratamientos A, B y C). Junto con este procedimiento, se tomó diariamente una muestra de la columna de agua para evaluar la cantidad de  $Pb^{2+}$  remanente según el procedimiento descrito en el apartado 3.4.

### **3.7. Determinación de la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* ante la exposición continua a baja concentración $Pb^{2+}$ durante un periodo prolongado.**

Mediante este ensayo se indagó la capacidad de la planta para eliminar  $Pb^{2+}$  en muestras de agua contaminadas artificialmente frente a una exposición continua y prolongada a la concentración más baja evaluada. Para ello, se procedió en forma análoga al protocolo descrito en el apartado 4.8 dosificando diariamente al vegetal con la concentración más baja del metal, por un período de 44 días. Se tomaron muestras de la columna de agua cada 2-3 días hasta que visualmente se evidenció un deterioro grave del aspecto general de las plantas.

### **3.8. Análisis estadístico.**

Se empleó el programa SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Estados Unidos). Los datos experimentales fueron analizados aplicando el *test* de ANOVA (análisis de la variancia). Cuando el efecto de los factores estudiados fue significativo ( $p < 0,05$ ) se aplicó la prueba *Honestly Significant Difference* (HSD) de *Tukey* para efectuar comparaciones múltiples con un nivel de confianza del 95 %.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

Dentro de los objetivos propuestos en la Cumbre para el Desarrollo Sostenible llevada a cabo en Nueva York (EE.UU.) en septiembre del 2015, los estados miembros de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) aprobaron en la Agenda 2030 el objetivo de “Garantizar la disponibilidad de

agua y su gestión sostenible y saneamiento para todos”. Por lo tanto, con vistas al año 2030, se plantea mejorar la calidad del agua tomando acciones que permitan, de manera gradual, reducir la contaminación, eliminar el vertido y minimizar la emisión de productos químicos y materiales peligrosos; como así también, disminuir el porcentaje de aguas residuales sin tratar, y aumentar el reciclado y la reutilización sin riesgos de las aguas saneadas.

Siguiendo esta línea de pensamiento, los hallazgos que se describen en este trabajo de tesis tienen como finalidad mostrar el potencial que ofrece *Salvinia biloba* Raddi, una macrófita de flotación libre autóctona de nuestra región, como herramienta sostenible para el saneamiento de aguas residuales contaminadas con  $Pb^{2+}$ .

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de una serie de ensayos con agua contaminada artificialmente bajo dos variables de análisis: *intensidad y periodicidad* de la descarga contaminante.

#### **4.1. Evaluación de la eficiencia de remoción de $Pb^{2+}$ frente a descargas diarias con agua artificialmente contaminada.**

Durante un periodo de diez (10) días consecutivos se evaluó la capacidad de *S. biloba* para remover  $Pb^{2+}$  en muestras de agua contaminadas artificialmente empleando un modelo de ensayo operado por lotes (Fig. 4.1). Se utilizaron cuatro concentraciones de metal:

1,88±0,15 mg/L; 2,65±0,07 mg/L; 12,62±0,02 mg/L y 30,57±0,01 mg/L.

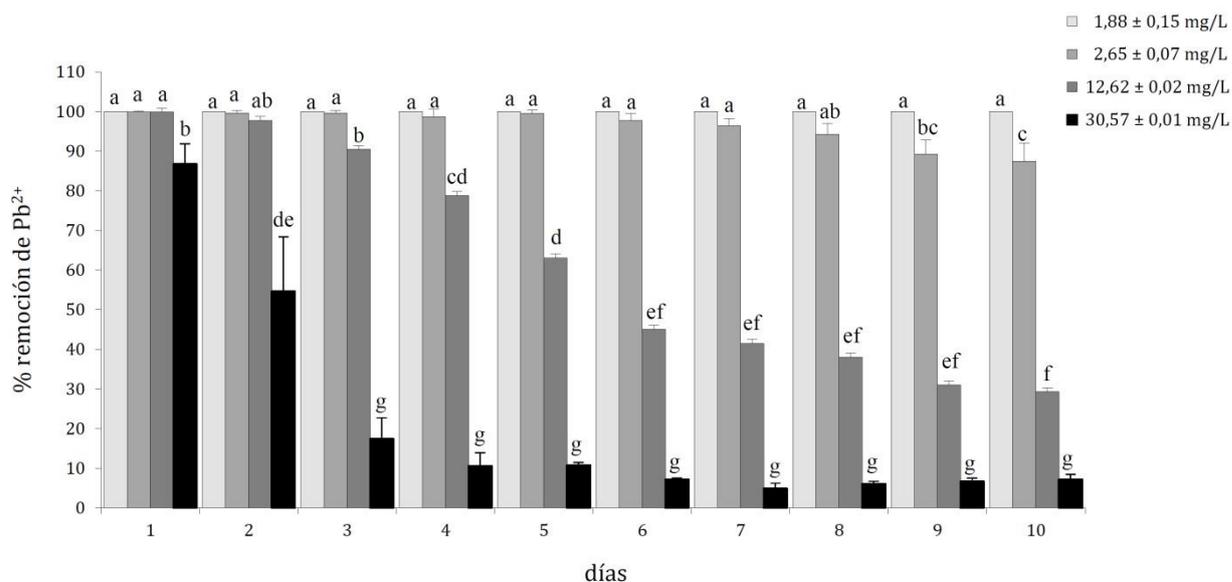
Adicionalmente, se evaluó un grupo de plantas *control* no expuesto a  $Pb^{2+}$ .

La capacidad de remoción del contaminante se determinó cada 24 h posteriores a cada descarga, cuantificando la concentración de metal remanente en la columna de agua.



**Figura 4.1.** Fotografías ilustrativas del sistema experimental por lotes utilizado en el presente estudio.

Como era de esperarse, no se detectó presencia de  $Pb^{2+}$  en la columna de agua para el grupo control durante los 10 días de ensayo, demostrando la ausencia de contaminación previa o externa. A su vez, estos resultados permiten concluir positivamente acerca de la pertinencia de las condiciones experimentales en las cuales se llevó adelante el presente estudio. De igual forma, tampoco pudo evidenciarse la presencia de metal en el medio contaminado diariamente con una concentración de  $Pb^{2+}$  de  $1,88 \pm 0,15$  mg/L durante los 10 días de evaluación, demostrando que en esas condiciones *S. biloba* posee una capacidad de remoción del metal del 100%. Para el resto de las concentraciones ensayadas, las plantas mostraron un decaimiento en la capacidad de remoción diaria del metal, y esta disminución fue mayor a medida que aumentó la concentración de  $Pb^{2+}$  a la que fueron expuestas (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Remoción de Pb<sup>2+</sup> por *S. biloba* expuesta a la descarga diaria de agua artificialmente contaminada con diferentes concentraciones de Pb<sup>2+</sup>. Las barras representan el promedio ± su desvío estándar para un  $n=3$ .

A su vez, es notable observar la elevada eficiencia de *S. biloba* para remover Pb<sup>2+</sup> durante las primeras 24 h, aún a concentraciones tan elevadas del metal como 30,57±0,01 mg/L. (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.**

Porcentaje de remoción de Pb<sup>2+</sup> de la columna de agua por *S. biloba* luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones del metal.

[Pb <sup>2+</sup> ] (mg/L)	% de remoción
1,88±0,15	100%
2,65±0,07	99,9±0,2%;
12,62±0,02	99,9±0,1 %
30,57±0,01	86,7±5,1 %.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, donde se ha demostrado la elevada capacidad del género *Salvinia* para remover diferentes metales pesados durante las primeras 24 h en muestras de agua contaminadas artificialmente. Por ejemplo, **SánchezGalván y col. (2008)** evaluaron la capacidad de remoción de  $Pb^{2+}$  por *S. minima* empleando un rango de concentraciones ( $0,8\pm 0,0$  mg/L a  $28,40\pm 0,22$  mg/L) similar al utilizado en la presente investigación. Luego de 24 h de exposición al metal, estos autores obtuvieron porcentajes de remoción cercanos al 95% para la mayoría de las concentraciones de  $Pb^{2+}$  evaluadas, excepto para  $28,40\pm 0,22$  mg/L donde se alcanzó una remoción máxima de  $88,78\pm 0,32\%$ . De manera análoga, en el presente estudio, el porcentaje de remoción obtenido para la concentración de  $Pb^{2+}$  más alta ensayada ( $30,57\pm 0,01$  mg/L) fue cercano al 87%.

En un estudio similar, **Paris y col. (2005)** evaluaron la capacidad de remoción de 1 mg/L de  $Pb^{2+}$  empleando *S. herzogii* (sinónimo de *S. biloba*) y *Pistia stratiotes*. En las primeras 24 h, estos autores informaron un porcentaje de remoción elevado, cercano al 90%, para ambas especies. De igual manera, en una experiencia análoga utilizando *S. rotundifolia* en contacto con 1,8 mg/L de  $Pb^{2+}$ , **Banerjee y Sarker (1997)** reportaron una tasa de remoción final para este metal del 95%. En comparación con estas experiencias previas, nuestros resultados sugieren que *S. biloba* sería una especie más eficiente para eliminar  $Pb^{2+}$  a bajas concentraciones, e incluso mayores ( $2,65\pm 0,07$  y  $12,62\pm 0,02$  mg/L), alcanzando niveles de remoción superiores al 99% (Tabla 4.1). Adicionalmente, los porcentajes de remoción de  $Pb^{2+}$  obtenidos en este estudio a las 24 h de la primera descarga, concuerdan con aquellos

reportados por **Tello Zevallos y col. (2015)** para *S. biloba*, en un trabajo que antecede a la presente investigación. Estos autores reportaron eficiencias de remoción de  $98,2\pm 0,8\%$ ;  $96,2\pm 0,5\%$  y  $91,2\pm 1,9\%$  para;  $9,1\pm 0,4$  y  $19,6\pm 0,5$  mg/L de  $Pb^{2+}$ , respectivamente. Adicionalmente, nuestros resultados demuestran que *S. biloba* es aun altamente eficiente para retirar concentraciones de  $Pb^{2+}$  aún mayores ( $30,57\pm 0,01$  mg/L), durante las primeras 24 h. A su vez, los valores de remoción alcanzados por *S. biloba* a las 24 h de exposición a  $1,88\pm 0,15$  mg/L y  $2,65\pm 0,07$  mg/L de  $Pb^{2+}$  fueron cercanos al 100%, en correlación con lo informado por **Tello Zevallos y col. (2015)** para la concentración más baja ( $4,8\pm 0,3$  mg/L).

A partir de la segunda descarga, como se evidencia en la Figura 4.2, la eficiencia de remoción de las plantas varió, siendo determinante la concentración del metal para sostener esta capacidad en el tiempo. Por ejemplo, cuando la descarga diaria se llevó a cabo con agua contaminada a una concentración de  $2,65\pm 0,07$  mg/L de  $Pb^{2+}$ , el porcentaje de remoción se mantuvo prácticamente invariable por 8 días, a valores similares al alcanzado en las primeras 24 h. Durante ese periodo, los porcentajes de remoción se mantuvieron en  $93,9\pm 2,9\%$ . A partir de la descarga del día nueve, el porcentaje de remoción cayó significativamente ( $p<0,05$ ) con respecto a la remoción alcanzada en los primeros 7 días. Para el final del periodo de evaluación (10 días) el porcentaje de remoción alcanzado por las plantas fue  $86,8\pm 4,8\%$ .

En contraste, al enfrentar *S. biloba* a una concentración de  $Pb^{2+}$  de  $12,62\pm 0,02$  mg/L el porcentaje de remoción se mantuvo por encima del 90% hasta el día tres, disminuyendo significativamente a partir del cuarto día. Al final del ensayo (10 días), el porcentaje de remoción cayó hasta un

29,5±8,0 % (Figura 4.2). Este fenómeno fue más evidente a la máxima concentración de Pb<sup>2+</sup> evaluada (30,57±0,01 mg/L). En este caso, la eficiencia de remoción fue significativamente menor (86,72±5,05 %) a la obtenida en las primeras 24 h para las concentraciones más bajas. Además, la eficiencia decayó marcadamente en tan sólo tres días para mantenerse por debajo del 7% hasta el final del periodo ensayado. Estos resultados demuestran la gran capacidad de la especie *S. biloba* para remover Pb<sup>2+</sup> ante descargas continuas de agua contaminada con bajas concentraciones del metal.

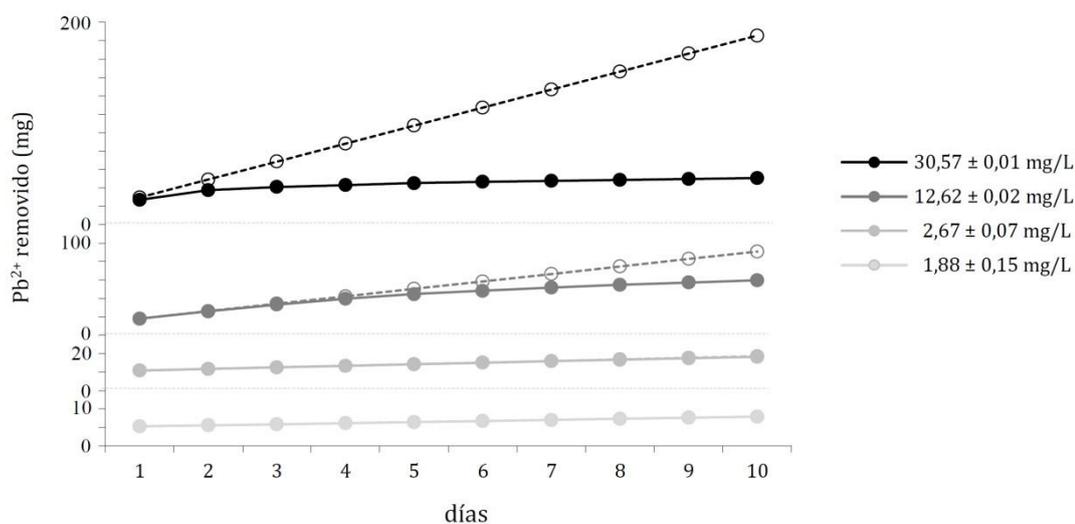
Numerosos autores han reportado que las características fisicoquímicas de la biomasa de *Salvinia* juegan un papel fundamental en la eliminación de metales pesados (**Sánchez Galván y col., 2008; Dhir, 2009**). En general, los iones metálicos son adsorbidos en la superficie de las células vegetales a través de interacciones electrostáticas que se dan entre los cationes metálicos y ciertos grupos funcionales presentes en las paredes celulares de *Salvinia*, tales como carboxilos, fosfatos e hidroxilos (**Hashim y Chu, 2004**). Más aún, **Schneider y Rubio (1999)** reportaron que los grupos carboxilo serían los principales responsables de la adsorción de metales en *S. herzogii*. Notablemente, **Vidal (2009)** demostró que las altas intensidades lumínicas favorecen la formación de grupos carboxílicos en las células de *S. minima*, sugiriendo que la capacidad de remoción de metales podría verse positivamente afectada al modificar este parámetro.

Por otro lado, la superficie específica de un biosólido es de especial importancia en el análisis de los fenómenos de adsorción. En este sentido, **Schneider y Rubio (1999)** evaluaron diferentes macrófitas acuáticas demostrando que *S. herzogii* (*i.e.*, *S. biloba*) posee una gran área superficial

(270 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). **Sánchez Galván y col. (2008)** evaluaron las características fisicoquímicas de *S. minima* obteniendo valores similares de superficie específica (264±13 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) comparables a los reportados para *S. herzogii* (**Schneider y Rubio, 1999**) y *E. crassipes* (250 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>), una especie reconocida por un abundante sistema radicular responsable de su elevada capacidad para eliminar metales (**Jayaweera y col., 2008**). Adicionalmente, muchos vegetales suelen expresar una serie de péptidos ricos en ácido glutámico y cisteína, denominados *fitoquelatinas*. **Estrella y col. (2009)** determinaron que estas proteínas se encuentran involucradas en la bioacumulación de Pb<sup>2+</sup> por *S. minima*. Estos autores demostraron que la presencia de Pb<sup>2+</sup> en el agua contaminada induce la sobre producción de fitoquelatinas, la cuales serían responsables de captar y complejar al metal permitiendo su almacenamiento en vacuolas y compartimentos intracelulares, disminuyendo así sus efectos citotóxicos.

En la Figura 4.3, se muestran las curvas comparativas entre la cantidad (mg) de Pb<sup>2+</sup> captado por la biomasa de *S. biloba* (adsorbido y/o acumulado) frente a la cantidad total de metal a la que fueron expuestas durante los 10 días de descargas continuas cada 24 h. Como puede evidenciarse, a concentraciones bajas de 1,88±0,15 mg/L y 2,65±0,07 mg/L de Pb<sup>2+</sup>, los individuos captaron prácticamente la totalidad del metal a la que fueron expuestos. Sin embargo, las plantas expuestas a descargas continuas de 12,62±0,02 mg/L y 30,57±0,01 mg/L de Pb<sup>2+</sup> disminuyeron significativamente la proporción de Pb<sup>2+</sup> captado, siendo notablemente mayor esta diferencia a la máxima concentración estudiada (Figura 4.3). A través de un análisis de compartimentalización, **Tello Zevallos y col. (2015)** demostraron que el porcentaje de Pb<sup>2+</sup> adsorbido en *S. biloba* es

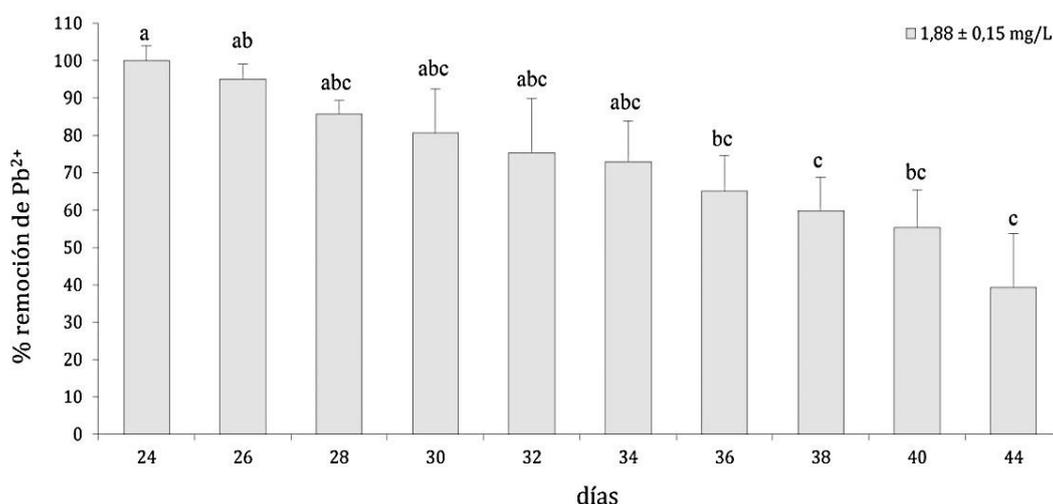
directamente proporcional a la concentración inicial de metal, sugiriendo que a concentraciones elevadas se saturan los sitios activos presentes en la superficie radicular. Esto podría justificar la tendencia observada en las Figuras 4.2 y 4.3, donde los porcentajes de remoción y la cantidad de  $Pb^{2+}$  captado en la biomasa de *Salvinia* para  $12,62 \pm 0,02$  mg/L y  $30,57 \pm 0,01$  mg/L de  $Pb^{2+}$  decaen significativamente con cada descarga sucesiva. Adicionalmente, la exposición a altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  y/o a concentraciones moderadas, pero mantenidas en el tiempo, podría provocar modificaciones fisiológicas agudas en las células vegetales, a causa de su reconocida toxicidad, afectando notablemente la capacidad de acumulación del metal, tal como describiremos más adelante.



**Figura 4.3.** Comparación entre la cantidad (mg) de  $Pb^{2+}$  removido por la biomasa de *S. biloba* (línea sólida) frente a la cantidad total suministrada (línea punteada) durante 10 días de descarga diaria con agua contaminada con diferentes concentraciones de metal.

#### 4.2. Evaluación de la eficiencia de remoción de $Pb^{2+}$ frente a la descarga prologada de agua contaminada con bajas concentraciones de metal.

Como se demostró en el apartado anterior, la eficiencia de remoción de  $Pb^{2+}$  por *S. biloba* se mantuvo al máximo durante 10 días de exposición diaria a  $1,88 \pm 0,15$  mg/L de metal. Por este motivo, se decidió extender el tiempo de análisis por un periodo de 44 días con el objetivo de evaluar su comportamiento a más largo plazo. Como puede observarse en la Figura 4.4, el porcentaje de remoción de  $Pb^{2+}$  se mantuvo, muy notablemente, en valores cercanos al 100% hasta el día 24, luego del cual comenzó a decaer gradualmente hasta alcanzar un mínimo de ~45% al final del ensayo (día 44).



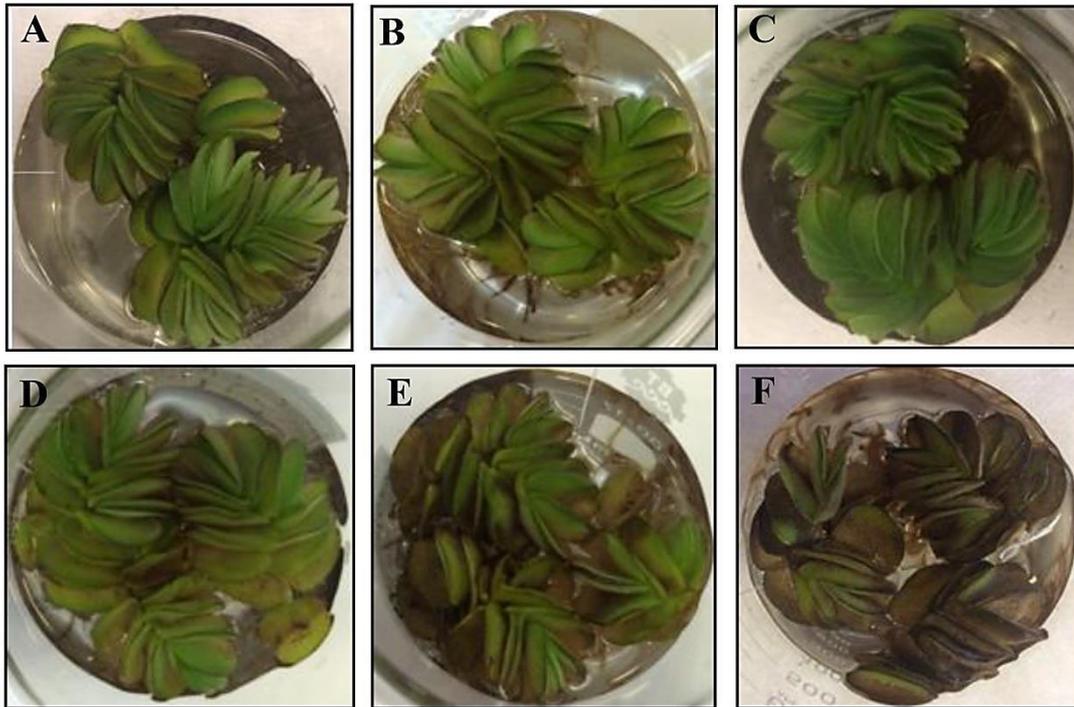
**Figura 4.4.** Variación en la capacidad de remoción de  $Pb^{2+}$  por *S. biloba* frente a la exposición prolongada (44 días) a descargas diarias de agua contaminada con  $1,88 \pm 0,15$  mg/L de metal. Las barras representan el promedio  $\pm$  su desvío estándar para un  $n=3$ .

Sin embargo, mediante la inspección visual de los especímenes, a partir del día 14 de exposición continua a descargas diarias de agua contaminada con  $1,88 \pm 0,15$  mg/L de  $Pb^{2+}$ , pudieron evidenciarse algunos signos claros de fitotoxicidad, tales como ausencia de pigmentación

(clorosis), síntomas de necrosis en todas las hojas, disminución en el tamaño de la lámina foliar y pérdida de turgencia. A pesar de ello, estos resultados permiten afirmar que *S. biloba* es altamente eficiente para captar y almacenar metales pesados, ofreciéndose como una potente herramienta para ser utilizada en procesos de fitorremediación de aguas contaminadas con bajas concentraciones de metales pesados, bajo condiciones de volcamiento continuo.

#### **4.3. Fitotoxicidad del $Pb^{2+}$ en *S. biloba* expuesta a la descarga continua de agua artificialmente contaminada.**

Los efectos fitotóxicos observados en la biomasa de *S. biloba* a los 10 días de recibir descargas diarias de agua contaminada con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$  se muestran en la Figura 4.5. Como puede evidenciarse en las fotografías D, E y F (Fig. 4.5.), cuando las plantas se expusieron a concentraciones de  $2,65 \pm 0,07$  mg/L,  $12,62 \pm 0,02$  mg/L, y  $30,57 \pm 0,01$  mg/L de  $Pb^{2+}$ , respectivamente, se observó una disminución en la coloración de las hojas (clorosis), pérdida de turgencia (alteraciones de tamaño y forma), y signos de necrosis (muerte celular), tanto en las frondas juveniles como en las más desarrolladas.



**Figura 4.5.** Fotografías ilustrativas de los cambios observados en la biomasa de *S. biloba* expuesta durante 10 días a descargas diarias de agua contaminada con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ . A) Control (día 0), B) Control (día 10), C)  $1,88 \pm 0,15$  mg/L (día 10), D)  $2,65 \pm 0,07$  mg/L (día 10), E)  $12,62 \pm 0,02$  mg/L (día 10) y, F)  $30,57 \pm 0,01$  mg/L (día 10).

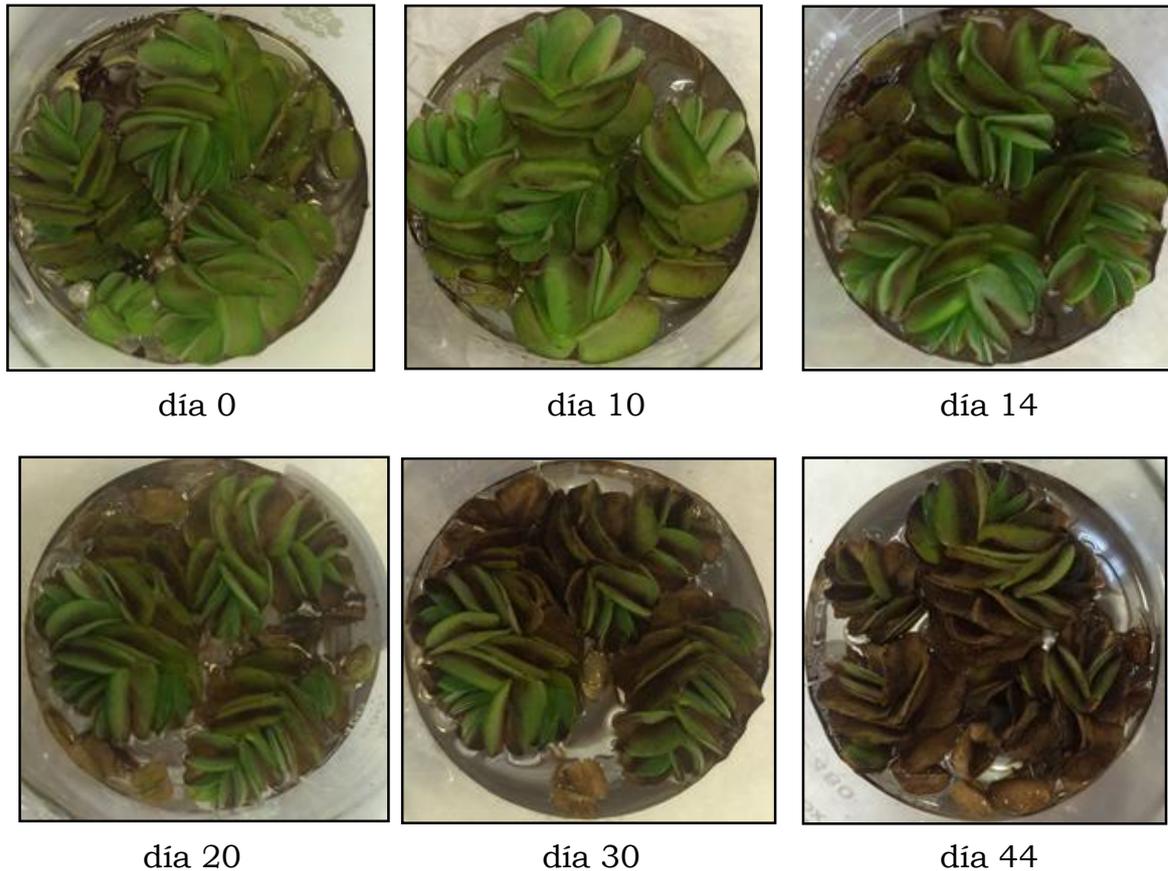
Además, en un análisis al microscopio, se pudo determinar que la necrosis del tejido se presentó marcadamente en aquellas zonas de mayor contacto con el agua contaminada y en menor proporción hacia las zonas más superficiales. Estos cambios fueron más evidentes cuanto mayor fue la concentración del metal y, especialmente notorios, en las papilas ubicadas en la epidermis foliar (Figura 4.6). Además, se pudo determinar que las plantas expuestas a  $2,65 \pm 0,07$  mg/L de  $Pb^{2+}$  presentaron signos de fitotoxicidad en menos de la mitad de su área foliar mientras que aquellos especímenes expuestos a concentraciones mayores mostraron aproximadamente más de la mitad del área foliar con daño, siendo especialmente notorio en las plantas expuestas a una concentración de

30,57±0,01 mg/L de Pb<sup>2+</sup>.



**Figura 4.6.** Fotografía representativa que muestra el deterioro observado en las papilas de la epidermis (izquierda) en frondas de *S. biloba* expuestas a Pb<sup>2+</sup>.

Por el contrario, a los 10 días, tanto el grupo control como los ejemplares expuestos a 1,88±0,15 mg/L de Pb<sup>2+</sup> (Fig. 4.5 B y C, respectivamente) no mostraron cambios aparentes en su estado fisiológico respecto de su condición inicial (Fig. 4.5 A). Sin embargo, cuando este ensayo se prolongó en el tiempo, los efectos fitotóxicos del metal comenzaron a hacerse evidentes a partir del día 14 (Fig. 4.7). Al cabo de 44 días de exposición a descargas diarias de agua contaminada con 1,88±0,15 mg/L de Pb<sup>2+</sup> las plantas se notaron muy afectadas, con un elevado nivel de necrosis y un marcado deterioro de las frondas (Fig. 4.7).



**Figura 4.7.** Fotografías ilustrativas de los efectos fitotóxicos del  $Pb^{2+}$  en la biomasa de *S. biloba* expuesta durante 44 días a descargas diarias de agua contaminada con  $1,88 \pm 0,15$  mg/L del metal.

Todas estas observaciones preliminares fueron corroboradas mediante la cuantificación de la concentración de pigmentos fotosintéticos y antioxidantes (asociados con la coloración de la materia vegetal), y a través de la estimación del índice de estabilidad de membrana (vinculado con los cambios de turgencia), tal como se discutirá a continuación.

#### **4.4. Evaluación de parámetros fisiológicos en *S. biloba* luego de 10 días de exposición diaria a muestras de agua contaminada con $Pb^{2+}$ .**

Numerosas investigaciones han demostrado que la presencia de metales pesados en el medio de desarrollo altera considerablemente los

parámetros fisiológicos, tanto en individuos del género *Salvinia* como en otras macrófitas acuáticas (**Gardner y Hamdani, 1997; Nichols y col., 2000; Al Hamdani y Blair, 2004**). En el presente estudio, además de las alteraciones observadas en la biomasa de *S. biloba* producto de la fitotoxicidad del  $Pb^{2+}$  (descritas en el apartado anterior), la exposición al metal también modificó significativamente algunos valores fisiológicos. A continuación, se detallan los resultados obtenidos al evaluar, en frondas (hojas) y lacinias (raíces), el índice de estabilidad de la membrana (MSI) y la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila total y carotenoides), pigmentos antioxidantes (antocianinas y flavonoides) y carbohidratos solubles.

#### **4.4.1. Pigmentos fotosintéticos.**

Los pigmentos fotosintéticos fueron los parámetros fisiológicos más sensibles al impacto de la toxicidad producto de la exposición a  $Pb^{2+}$ . En el caso de las frondas, cuando las plantas se enfrentaron durante 10 días a la descarga diaria de agua contaminada con concentraciones de  $2,65 \pm 0,07$  mg/L,  $12,62 \pm 0,02$  mg/L, y  $30,57 \pm 0,01$  mg/L de  $Pb^{2+}$ , la cantidad de clorofilas (*a* y total) y carotenoides disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto del grupo control. Este efecto fue mayor a medida que la concentración de metal aumentó. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para las plantas control y aquellas expuestas a  $1,88 \pm 0,07$  mg/L de  $Pb^{2+}$  (Tabla 4.2).

#### **Tabla 4.2.**

Contenido de pigmentos fotosintéticos en frondas de *S. biloba* luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ .

		Frondas (Hojas)			
		[ $Pb^{2+}$ ] mg/L			
Variables fisiológicas	control	1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01
<i>Chl<sub>a</sub></i> (µg/g FW)	317 ± 24 <sup>a</sup>	300 ± 24 <sup>a</sup>	247 ± 8 <sup>b</sup>	222 ± 21 <sup>bc</sup>	198 ± 15 <sup>c</sup>
<i>Chl<sub>total</sub></i> (µg/g FW)	426 ± 31 <sup>a</sup>	405 ± 32 <sup>a</sup>	330 ± 10 <sup>b</sup>	302 ± 27 <sup>b</sup>	311 ± 28 <sup>b</sup>
<i>Carotenoides</i> (µg/g FW)	78 ± 5 <sup>a</sup>	75 ± 6 <sup>a</sup>	72 ± 6 <sup>ab</sup>	64 ± 4 <sup>b</sup>	31 ± 2 <sup>c</sup>

Estos resultados se corresponden con las observaciones realizadas sobre la biomasa de *S. biloba*, descritas previamente (Fig. 4.5). Por otro lado, como era de esperarse, las lacinias presentaron una cantidad inferior de pigmentos fotosintéticos en comparación con las frondas y, a diferencia de estas, sus valores sólo fueron significativamente afectados frente a la exposición a 30,57±0,01 mg/L de  $Pb^{2+}$  (Tabla 4.3). Esta diferencia en el grado de toxicidad entre frondas y lacinias podría deberse a que en las raíces el metal queda mayormente adsorbido superficialmente mediante enlaces de tipo iónico con grupos funcionales cargados negativamente (por ej., carboxilos), mientras que en las frondas el  $Pb^{2+}$  ha debido de ser incorporado a nivel intracelular, afectando directamente al metabolismo vegetal.

**Tabla 4.3.**

Contenido de pigmentos fotosintéticos en lacinias de *S. biloba* luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ .

		Lacinias (Raíces)			
		[ $Pb^{2+}$ ] (mg/L)			
Variables fisiológicas	control	1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01

<i>Chla</i> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	$33 \pm 7^a$	$27 \pm 11^{ab}$	$27 \pm 19^{ab}$	$26 \pm 13^{ab}$	$13 \pm 7^b$
<i>Chl<sub>total</sub></i> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	$43 \pm 12^a$	$35 \pm 14^a$	$21 \pm 10^{ab}$	$27 \pm 13^{ab}$	$20 \pm 6^b$
<i>Carotenoides</i> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	$14,4 \pm 5,4^a$	$11,7 \pm 2,5^a$	$7,3 \pm 2,6^{ab}$	$6,5 \pm 1,7^{ab}$	$5,8 \pm 1,4^b$

Estos resultados demuestran que el  $\text{Pb}^{2+}$  interfiere con el normal metabolismo de *S. biloba* ya que tanto las clorofilas como los carotenoides juegan un rol importante en la captación de luz solar para los procesos fotosintéticos de las plantas (**Leal y col., 2016**). A su vez, los carotenoides protegen a las moléculas de clorofila del daño oxidativo y estabilizan la bicapa lipídica de las membranas celulares previniendo la peroxidación provocada por las especies reactivas del oxígeno (ROS) (**Ramel y col., 2013**). Otros autores también han demostrado el impacto negativo del  $\text{Pb}^{2+}$  sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos en especies del género *Salvinia*. **Dhier y col. (2011)** determinaron que *S. natans* expuesta durante 48 h a 35 mg/L de  $\text{Pb}^{2+}$  mostró una clara disminución en el contenido de clorofila y carotenoides. Por otro lado, **Horton y col. (1996)** señalaron que la exposición a  $\text{Pb}^{2+}$  genera la producción de ROS que provocan cambios deletéreos en la estructura de los cloroplastos, alterando la composición de la membrana tilacoidal donde se depositan los pigmentos fotosintéticos.

Adicionalmente, otros estudios llevados a cabo con diferentes metales, tales como Cr y Ni, también han demostrado una disminución en el contenido de clorofila y carotenoides, tanto en plantas terrestres como acuáticas (**Rai y col., 2004; Unnikannan y col. 2011; Fuentes y col., 2014; Prado y col., 2016**).

#### 4.4.2. Pigmentos antioxidantes.

Los flavonoides y las antocianinas son los metabolitos secundarios más abundantes en mono y dicotiledóneas (**Caretto, 2015**). Estos compuestos protegen a los vegetales del daño ocasionado por diversos agentes oxidantes, razón por la cual se los agrupa bajo la denominación de *pigmentos antioxidantes*. Como se observa en la Tabla 4.4, la concentración de antocianinas en frondas de *S. biloba* luego de la exposición por 10 días a descargas diarias de agua contaminada con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$  no mostró diferencias significativas.

**Tabla 4.4.**

*Contenido de pigmentos antioxidantes en frondas de S. biloba luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ .*

		Frondas (Hojas)			
		[ $Pb^{2+}$ ] (mg/L)			
Variables fisiológicas	control	1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01
Antocianinas (nmol/g FW)	246 ± 37 <sup>a</sup>	240 ± 36 <sup>a</sup>	212 ± 45 <sup>a</sup>	185 ± 23 <sup>a</sup>	209 ± 17 <sup>a</sup>
Flavonoides (UA/g FW)	32 ± 5 <sup>a</sup>	33 ± 2 <sup>a</sup>	32 ± 5 <sup>a</sup>	32 ± 3 <sup>a</sup>	12 ± 3 <sup>b</sup>

Asimismo, la concentración de flavonoides en frondas de *S. biloba* expuesta durante 10 días a una descarga diaria de agua conteniendo 1,88±0,15 mg/L, 2,65±0,07 mg/L o 12,62±0,02 mg/L de  $Pb^{2+}$  se mantuvo invariable respecto al valor hallado para el grupo control, mientras que a 30,57±0,01 mg/L del metal, la cantidad de flavonoides disminuyó significativamente (Tabla 4.4).

Como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos son esenciales en los mecanismos de defensa de las plantas frente al estrés causado por agentes bióticos y abióticos (**Sgherri y col., 2003; Posmyky**

**col., 2009; Tolrá y col., 2009).** Estas moléculas pueden actuar como quelantes de iones metálicos, impidiendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por la acción de estos metales (**Michalak, 2006**). Los resultados de la Tabla 4.4 sugieren que las frondas de *S. biloba* poseen ciertos mecanismos para mantener los niveles de compuestos antioxidantes frente a la exposición a  $Pb^{2+}$ .

En este sentido, **Doncheva y col. (2013)** detectaron un aumento significativo en la actividad antioxidante de hojas de girasol (*Helianthus annuus*) expuestas a  $Pb^{2+}$ . **Bizzo y col. (2014)** reportaron un aumento en la cantidad de compuestos fenólicos totales en individuos de *S. auriculata* expuestos durante 48 h a un estrés abiótico inducido por la presencia de Cu(II). En un estudio reciente, **Prado y col. (2016)** observaron que la cantidad de tioles solubles totales se vio fuertemente aumentada en frondas de *S. rotundifolia* y *S. minima* frente a la exposición a Cr(VI), indicando que estos compuestos podrían estar involucrados en la tolerancia a los metales descripta para el género *Salvinia*.

Por otro lado, en las raíces, el efecto fitotóxico del  $Pb^{2+}$  a nivel de la cantidad de compuestos antioxidantes fue mayor que el observado en las hojas. La Tabla 4.5 resume los valores hallados de antocianinas y flavonoides en lacinias de *S. biloba* expuesta durante 10 días a descargas diarias de agua contaminada con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ .

**Tabla 4.5.**

*Contenido de pigmentos antioxidantes en lacinias de S. biloba luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ .*

Lacinias (Raíces)		
		[ $Pb^{2+}$ ] (ppm)

<i>Variables fisiológicas</i>	control	1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01
<i>Antocianinas (nmol/g FW)</i>	87 ± 11 <sup>a</sup>	77 ± 6 <sup>a</sup>	66 ± 2 <sup>b</sup>	64 ± 25 <sup>b</sup>	35 ± 9 <sup>b</sup>
<i>Flavonoides (UA/g FW)</i>	8,4 ± 2,4 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,9±0,7 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,8 <sup>b</sup>

En este caso, la cantidad de pigmentos antioxidantes se mantuvo invariable respecto del grupo control sólo para la concentración más baja ensayada (*i.e.*, 1,88±0,15 mg Pb<sup>2+</sup>/L), mientras que a concentraciones mayores la cantidad de antocianinas y flavonoides disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4.3. Carbohidratos solubles.**

La acumulación de carbohidratos solubles en *S. biloba*, luego de 10 días de exposición diaria a muestras de agua contaminada con diferentes concentraciones de Pb<sup>2+</sup>, mostró diferentes tendencias respecto al órgano de la planta estudiado. En las frondas, se observó una disminución en la cantidad de carbohidratos respecto al valor control conforme el aumento en la concentración del metal presente en el agua de descarga; si bien esta disminución sólo fue estadísticamente significativa para la exposición sucesiva a 30,57±0,01 mg/L de Pb<sup>2+</sup> (Tabla 4.6). **Dhir y col. (2011)** reportaron que la presencia de metales pesados en el ambiente afecta la producción de carbohidratos solubles en *Salvinia*, resultando en una disminución de su capacidad fotosintética. **Bizzo y col. (2014)** evaluaron la producción de carbohidratos en *S. auriculata* frente a la exposición a Cu(II) durante 48 h. Estos autores observaron una merma en la concentración de estos compuestos solubles en las frondas, fenómeno que

estuvo directamente asociado con la inhibición del crecimiento (**García, 2006**).

**Tabla 4.6.**

Contenido de carbohidratos solubles en frondas y lacinias de *S. biloba* luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ .

Órgano vegetal	Carbohidratos Solubles (mg/g)				
	control	[ $Pb^{2+}$ ] (mg/L)			
		1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01
<i>Frondas (hojas)</i>	160 ± 30 <sup>a</sup>	155 ± 14 <sup>a</sup>	146 ± 30 <sup>a</sup>	126 ± 22 <sup>a</sup>	46 ± 6 <sup>b</sup>
<i>Lacinias (raíces)</i>	18 ± 8 <sup>a</sup>	23 ± 5 <sup>a</sup>	45± 20 <sup>b</sup>	41 ± 6 <sup>b</sup>	45 ± 6 <sup>b</sup>

Por el contrario, en lacinias, esta tendencia fue contraria a la observada en frondas ya que el contenido de carbohidratos solubles aumentó; siendo estas diferencias estadísticamente significativas respecto del valor hallado para el grupo control ( $p<0,05$ ) a concentraciones de  $Pb^{2+}$  de 2,65±0,07 mg/L, 12,62±0,02 mg/L y 30,57±0,01 mg/L (Tabla 4.6).

Otros autores han reportado fenómenos similares a los hallados para las raíces de *S. biloba* en macrófitas filogenéticamente relacionadas con esta especie, expuestas a metales pesados. **Wilson y Al-hamdani (1997)** observaron que la exposición a Cr(VI) provoca un aumento en los niveles de carbohidratos de *Azolla caroliniana*. **Prado y col. (2008)** reportaron un aumento en el contenido de sacarosa en individuos de *S. minima* expuestos a Al(III). Además, **Rosa y col. (2009)** señalaron que diferentes condiciones

de estrés ambiental pueden provocar una inducción en la síntesis de carbohidratos, ya que estos compuestos no solo actúan como constituyentes estructurales de las células sino también como moléculas de señalización intracelular involucradas en la regulación de procesos metabólicos asociados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Dado que las raíces juegan un papel muy activo en el manejo de los nutrientes, es dable especular que el estrés provocado por la exposición al  $Pb^{2+}$  haya producido un aumento en la cantidad de carbohidratos solubles en lacinias de *S. biloba*.

#### **4.4.4. Índice de estabilidad de la membrana.**

La estabilidad de la membrana plasmática (MSI) de las células vegetales, tanto en frondas como en lacinias, se determinó mediante la estimación de la cantidad de electrolitos liberados al medio a causa del daño a nivel de los tejidos provocado por el efecto fitotóxico del  $Pb^{2+}$ . Como se detalla en la Tabla 4.7, las frondas de las plantas que recibieron durante 10 días una descarga diaria de agua sin  $Pb^{2+}$  (grupo control) mostraron un valor máximo de MSI de  $70 \pm 5\%$ . Este valor no fue estadísticamente diferente respecto a los hallados en frondas de *S. biloba* expuesta a  $1,88 \pm 0,15$  mg/L,  $2,65 \pm 0,07$  mg/L y  $12,62 \pm 0,02$  mg/L de  $Pb^{2+}$ , por el mismo periodo de tiempo. Solamente las frondas expuestas a una concentración  $30,57 \pm 0,01$  mg $Pb^{2+}$ /L mostraron una disminución significativa en este valor, indicativo de un severo daño a nivel de las membranas.

**Tabla 4.7.**

Índice de estabilidad de la membrana (%MSI) en frondas y lacinias de *S. biloba* luego de 10 días de descargas diarias a muestras de agua contaminada con diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$ .

Órgano vegetal	Índice de Estabilidad de Membrana (%MSI)				
		[ $Pb^{2+}$ ] (mg/L)			
	control	1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01
Frondas (hojas)	70 ± 5 <sup>a</sup>	74 ± 2 <sup>a</sup>	73 ± 2 <sup>a</sup>	67 ± 11 <sup>a</sup>	17 ± 10 <sup>b</sup>
Lacinias (raíces)	58 ± 7 <sup>a</sup>	57 ± 3 <sup>a</sup>	51 ± 10 <sup>b</sup>	43 ± 2 <sup>b</sup>	30 ± 21 <sup>b</sup>

Lo contrario ocurrió a nivel de las lacinias, donde sólo a la concentración más baja evaluada (*i.e.*, 1,88±0,15 mg $Pb^{2+}$ /L) no se observaron diferencias significativas en el valor de %MSI respecto al grupo control, mientras que a concentraciones superiores el efecto tóxico del metal fue más evidente (Tabla 4.7). Esta diferencia en los valores de %MSI entre frondas y lacinias sugiere una participación más activa de estos últimos órganos en la captura y almacenamiento del metal. Al respecto, estudios realizados por **Hoffman y col. (2004)** determinaron que del 88% del  $Pb^{2+}$  removido por *S. minima* en muestras de agua contaminadas artificialmente con 20 mg/L del metal, luego de 24 h de exposición, el 75% fue acumulado en las raíces mientras que el 13% fue acumulado en los rizomas. Más recientemente, **Leal y col. (2016)** analizaron la proporción de  $Pb^{2+}$  incorporado en *S. minima* luego de 24 h de exposición a una solución de  $Pb(NO_3)_2$  40µM determinando que, de la cantidad total de metal almacenado en toda la planta, las lacinias acumularon seis veces más que las frondas. Además, estos autores observaron que la tasa de liberación de electrolitos

en lacinias fue menor que en las frondas, lo cual refleja que debido a la mayor acumulación de  $Pb^{2+}$  en las raíces, el daño a nivel de las membranas celulares fue superior. Asimismo, estos autores determinaron los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) entre el contenido de  $Pb^{2+}$  en lacinias, la disminución en los valores de %MSI y la pérdida de actividad fotosintética en las partes aéreas, reportando valores de  $r^2$  entre 0,84 y 0,97. Nuestros resultados, sugieren la existencia de una correlación entre los valores de %MSI en lacinias y la pérdida en la eficiencia de remoción de  $Pb^{2+}$  en *S. biloba*.

En general, durante las primeras etapas de un proceso de fitorremediación, los iones metálicos se adsorben e incorporan en las raíces de las plantas donde son almacenados mediante la formación de complejos con aminoácidos, la unión a péptidos/proteínas, y/o secuestrados en vacuolas intracelulares. Estos mecanismos restringen su translocación hacia los órganos superiores, y protege a los tejidos de las hojas, particularmente de las células fotosintéticamente, del daño provocado por la acumulación de metales pesados. Por lo tanto, es factible suponer que la disminución en la eficiencia de remoción de metales por las plantas se encuentra mayormente vinculada con la pérdida de la integridad de sus raíces.

#### **4.5. Evaluación de parámetros fisiológicos en *S. biloba* luego de 44 días de exposición diaria a muestras de agua contaminada con $Pb^{2+}$ .**

A partir de los resultados presentados en el apartado anterior, se comprobó que la exposición diaria de *S. biloba*, durante 10 días, a muestras de agua contaminada con  $1,88 \pm 0,15$  mg/L de  $Pb^{2+}$  no afectó de manera

significativa los valores obtenidos para los diferentes parámetros fisiológicos evaluados (índice de estabilidad de membrana, concentración de pigmentos fotosintéticos y antioxidantes, contenido de carbohidratos solubles), respecto del grupo control. Estos hallazgos, son compatibles con los altos porcentajes de remoción observados en las Figuras 4.2 y 4.3, los cuales sugieren que, bajo estas condiciones, las plantas conservan su estado metabólico y fisiológico prácticamente inalterado. Sin embargo, cuando el tiempo de exposición a descargas diarias de agua contaminada con  $1,88 \pm 0,15$  mg/L de  $Pb^{2+}$  se extendió hasta 44 días, se evidenció una clara disminución en la capacidad de remoción a partir del día 26, alcanzando valores inferiores al 50% a los 44 días (Fig. 4.4). Adicionalmente, a partir del día 14 se comenzaron a evidenciar algunos signos asociados con la fitotoxicidad del  $Pb^{2+}$  (Fig. 4.7), siendo estos aún más evidentes al final del ensayo (44 días). Los resultados de la Tabla 4.8 sustentan estas observaciones, ya que, a diferencia de los valores hallados a 10 días, los parámetros fisiológicos de *S. biloba*, tanto en frondas como en lacinias, se vieron notablemente afectados después de 44 días de exposición diaria a soluciones acuosas contenido  $1,88 \pm 0,15$  mg/L de  $Pb^{2+}$ .

**Tabla 4.8.**

*Efecto de la exposición prolongada (44 días) a una descarga diaria con agua contaminada con 1,88 mg/L de  $Pb^{2+}$  en los parámetros fisiológicos de *S. biloba*.*

	Frondas (Hojas)		Lacinias (Raíces)	
	Control	+ $Pb^{2+}$	Control	+ $Pb^{2+}$
<b>Chl<sub>a</sub></b> (µg/g FW)	301 ± 31	63 ± 17*	29 ± 11	3,4 ± 0,4*
<b>Chl<sub>b</sub></b> ( µg/g FW)	124 ± 49	38 ± 9*	13 ± 15	1,4 ± 1,1*
<b>Chl<sub>total</sub></b> (µg/g FW)	417 ± 47	100 ± 26*	40 ± 15	4,8 ± 1,1*

<b>Carotenos</b> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	81 $\pm$ 32	27 $\pm$ 8*	12 $\pm$ 3	5,8 $\pm$ 0,4*
<b>Antocianinas</b> (nmol/g FW)	251 $\pm$ 35	196 $\pm$ 41*	62 $\pm$ 19	44 $\pm$ 15*
<b>Flavonoides</b> (UA/g FW)	36 $\pm$ 7	20 $\pm$ 4*	4,8 $\pm$ 1,0	2,7 $\pm$ 0,2*
<b>Carbohidratos</b> (mg/g FW)	178 $\pm$ 38	180 $\pm$ 78	16 $\pm$ 7	11 $\pm$ 1
<b>MSI (%)</b>	60 $\pm$ 15	45 $\pm$ 25*	58 $\pm$ 7	47 $\pm$ 5*
* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ )				

A nivel de las frondas, el contenido de pigmentos fotosintéticos y antioxidantes fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a los valores obtenidos para las plantas control. Además, la estabilidad de la membrana (MSI) también se mostró notablemente afectada. Solamente la cantidad de carbohidratos solubles se mantuvo estable. De manera análoga, la cantidad de pigmentos fotosintéticos, pigmentos antioxidantes, así como en el valor de %MSI en las lacinias de *S. biloba* mostraron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) respecto de los valores hallados para el grupo control. Al igual que lo observado en las frondas, la cantidad de carbohidratos solubles se mantuvo relativamente estable. Como se mencionó anteriormente, las plantas pueden responder a diferentes condiciones de estrés ambiental aumentando la síntesis de carbohidratos con el objetivo de mantener los constituyentes estructurales de las células y asegurar el funcionamiento de los procesos metabólicos asociados con su desarrollo **(Rosa y col., 2009).**

En resumen, estos resultados ponen en evidencia el gran potencial que posee la especie *S. biloba* para ser utilizada en el saneamiento de aguas contaminadas con  $\text{Pb}^{2+}$  mediante estrategias de fitorremediación. Los

resultados aquí presentados, sugieren que la incorporación de esta macrófita en el diseño de sistemas de tratamiento de efluentes industriales podría ser una estrategia exitosa para favorecer la remoción de metales pesados.

## V. CONCLUSIONES

---

1. *S. biloba* demostró un gran potencial como herramienta para el saneamiento de aguas contaminadas con  $Pb^{2+}$ , dada la elevada eficiencia de remoción del metal de la columna de agua y la capacidad para mantener dicha eficiencia en el tiempo.
2. Tanto la eficiencia de remoción de  $Pb^{2+}$  como el grado de toxicidad del metal sobre la fisiología vegetal dependen de la concentración y del tiempo de exposición al metal.
3. Los parámetros fisiológicos de *S. biloba* se vieron afectados frente a la exposición a  $Pb^{2+}$ , siendo mayor el grado de afectación a nivel de las lacinias, hecho que sugiere una participación relevante de este órgano en el proceso de eliminación del metal.

---

## VI. PROPUESTAS A FUTURO

---

1. Evaluar la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* para otros metales pesados frecuentes en aguas residuales industriales, y para contaminantes orgánicos emergentes.
2. Caracterizar la cinética de remediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en *S. biloba* utilizando distintos modelos cinéticos.
3. Determinar los mecanismos involucrados en la eliminación de contaminantes por *S. biloba* a través del estudio de sus características fisicoquímicas y biológicas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Al-Hamdani, S., & Blair, S. L. (2004). Influence of copper on selected physiological response in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. *Am Fern J*, 94, 47-56.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad , M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals- concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Banerjee, G., & Sarker, S. (1997). The role of *Salvinia rotundifolia* in scavenging aquatic Pb(II) pollution: a case study. *Bioprocess Engineering*, 17, 295-300.

- Bizzo, A. L., Intorne, A. C., Gomes, P. H., Susuki, M. S., & Esteves, B. D. (2014). Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 26(3), 268-277.
- Bolaños, S., Casas, J., & Aguirre, N. (2008). Análisis comparativo de la remoción de un sustrato orgánico por las macrofitas *Pistia stratiotes* y *Egeria densa* en un sistema batch. *Gestión y Ambiente*, 11(2), 39-48.
- Cantú, P. C. (2016). Los nuevos desafíos del desarrollo sustentable hacia 2030. *Ciencia UANL*, 19(80), 27-32.
- Cañizares Villanueva, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 131-143.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., & Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *Int. J.Mol. Sci.*, 16, 26378-26394.
- Chen, B., Christie, P., & Li, L. (2001). A Modified Glass Bead Compartment Cultivation System for Studies on Nutrient and Trace Metal Uptake by Arbuscular Mycorrhiza. *Chemosphere*, 42, 185-192.
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53, 325-330.
- Cirujano Bracamonte, S., A. Meco Molina, P. García Murillo & M. Chirino Argenta, (2014).-Flora acuática española. Hidrófitos vasculares. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. 320 pp

- De La Sota, E. R. (1939). Las especies argentinas del género *Salvinia*. *Darwiniana*. 3(2): 93-110.
- 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.
- Dhir, B., & Srivastava. S. (2013). Heavy metal tolerance in metal hyperaccumulator plant, *Salvinia natans*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 90, 720-724.
- 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., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., Sharma, P., Kumar , R., & Mehta , D. (2011). Dhir B, Sharmila P, Pardha Saradhi. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. *Ecotox Environ Safe*, 74:1678-1684.
- Dixit, R., Wasiullah, E., Malaviya , D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., 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.

- Doncheva, S., Moustakas, M., Ananieva, K., Chavdarova, M., Gesheva, E., Vassilevska, R., & Mateey, P. (2013). Plant response to lead in the presence or absence EDTA in two sunflower genotypes. *Environ. Sci. Pollut.*, 20, 823-833.
- Duffus, J. (2002). Heavy metal: a meaningful term? *Pure and Applied Chemistry*, 74, 793-807.
- El Mai, H. (2014). Técnicas de preconcentración en el análisis de metales traza. Fraccionamiento químico en el control de la contaminación metálica de la bahía de Tánger. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz.
- Ernst, W. H. (2000). Evolution of Metal Hyperaccumulation and Phytoremediation. *New Phytol*, 146, 357-357.
- Estrella, N. G., Mendoza, C. D., Moreno, S. R., González, M. D., Zapata, P. O., Martínez, H. A., & Santamaría, J. M. (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb<sup>2+</sup> by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCS expression and phytochelatin synthase activity, *Aquat. Toxicol.* 91, 320-328
- Forno, I. (1983). distribution of the *Salvinia auriculata* complex and keys to species identification. *Aquatic Botany*, 17, 71-83.
- Fuentes, I.I., Espadas-Gil, F., Talavera-May, 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. *Aquat Toxicol.* 155, 142-150.

- García, D. (2006). Efectos fisiológicos y compartimentación radicular en plantas de *Zea mays L.* expuestas a la toxicidad por plomo. Tesis. España: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Gardner, J.L., J. L., & Al-Hamdani, S. H. (1997). Interactive Effects of Aluminium and Humic Substances on *Salvinia*. *J. Aquat. Plant. Manage.*, 35, 30-34.
- González, M. I. (2016). “Mejoramiento de la fitoextracción en plantas nativas en suelos contaminados por actividades mineras en Puchuncaví y Quintero”. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Graeme, K., & Pollack, C. (1998). Heavy metal toxicity, part II: lead and metal fume fever. *The Journal of Emergency Medicine*, 2, 171-177.
- Halliwell, D., Turoczy, N., & Stagnitti, F. (2000). Lead concentrations in *Eucalyptus sp.* In a small coastal town. *Bull Environ Contam Toxicol*, 65, 583-590.
- Hashim, M. A., & Chu, K. H. (2004). Hashim, M.A., Chu, K. H. (2004). Biosorption of cadmium by brown, green and red seaweeds. *Chem Eng J.*, 97(2-3), 249-255.
- Hoffman, T., Kutter, C., & Santamaría, J. M. (2004). Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Eng Life Sci*, 4(1), 61-65.
- Horton P, Ruban AV, Walters RG. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*; 47:655–684
- Jayaweera, M. W., Kasturiarachchia, J. C., Kularatn, R. K., & Wijeyekoon,

- S. L. (2008). Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. *J Environ Manage*, 87(3), 450-460.
- Kumari, S., Kumar, B. and Sheel, R. (2016). Bioremediation of Heavy Metals by Serious Aquatic Weed, *Salvinia*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* , 5(9). 355-368
- Leal, D. A., Espadas, F., Sáenz, L., & Talavera, C. (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.
- Llugany, M., Tolrà, C., Poschnrieder, C., & Barceló, J. (2007). Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? *Ecosistemas*, 16 (2), 4-9.
- Martelo, J., & Lara, J. A. (2012). Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales: una revisión del estado del arte. *Ingeniería y Ciencia.*, 8(15), 221-243.
- Martínez, O. G., & Cacharani, D. (2011). *Salviniaceae*. *Aportes Botánicos de Salta-Serie Flora*, 11(1): 1-7.
- McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 277-282.

- Michalak, A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, 523-530.
- Nichols, P., Couch, J. D., & Al Hamdani, S. H. (2000). Selected Physiological Responses of *Salvinia minima* to different Chromium Concentrations. *Aquatic Botany*, 68, 313-319.
- Olguín, E. J., Sánchez-Galvan, G., Pérez, T., & Pérez, A. (2005). Surface adsorption intracellular accumulation and compartmentalization of Pb(II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11-12), 577-586.
- Olguín, E., 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, 121-131.
- Padmavathiamma, P. K., & Li, L. (2007). Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants. *Water, Air, & Soil Pollution*, 184, 105-126.
- Paiva, J. (1986).- *Salvinia* L. In Castroviejo, S. et al. (eds.). *Flora Ibérica* 1: 157-158. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Paris, C., Hadad, H. R., Maine, M. A., & 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.
- Posmyk, M.M., Janas, K.M. (2009). Melatonin in plants. *Acta Physiol. Plant* 31:1-11.
- Prado, C., Ponce, S. C., Pagano, E., Prado, F. E., & Rosa, M. (2016). Differential physiological responses of two *Salvinia* species to hexavalent chromium at a glance. *Aquatic Toxicology*, 175, 213-221.
- Prado, C., Rodríguez - Montenegro, F. E., & Prado, M. (2008). Efecto del cromo (VI) sobre el consumo de oxígeno y el contenido de azúcares solubles en plantas de *Salvinia minima*. Abstracts XXVIII. Reunión Argentina de Fisiología Vegetal.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Sci.* 167: 1159-1169
- Ramel, F., Mialoundama, A.S., Havaux, M. (2013). Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 64: 799-805
- Rial, A. (2013). Plantas acuáticas: aspectos sobre su distribución geográfica, condición de maleza y usos. *Biota Col*, 14, 79-91.
- Ronda, A. (2016). Preparación y aplicación de biosorbentes activados químicamente para la eliminación de plomo de medios acuosos. Tesis Doctoral, Granada, España: Univesidad de Granada.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, A., & Prado, F.

- (2009). Soluble sugars- Metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 4(5), 388-393.
- Rosas Rodríguez, N. (2001). Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Ilobregat. Ph.D.Tesis,. Universidad Politécnica de Cataluña.
- Rubio, C., Gutiérrez, A. J., & Martín Izquierdo, R. E. (2004). El plomo como contaminante alimentario. *Revista de Toxicología*, 72-80.
- Rubio, D. I., Calderón, R. A., Gualtero, A. P., Acosta, D. R., & Rojas, I. J. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión. *Ingeniería y Región*, 13(1), 73-90.
- Salas, M., & Quintana, G. (2016). *salvinia molesta* d. s. mitch. (salviniaceae), nueva cita para Canarias y España. *Botánica Macaronésica*, 29, 73-81.
- Sánchez-Galván, G., Monroy, O., Gómez, J., & Olguín, M. E. (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.
- Schneider, I., & Rubio, J. (1999). Sorption of Heavy Metal Ions by the Nonliving Biomass of Freshwater Macrophytes. *Environ Sci Technol*, 33, 2213-2217.

- Sgherri, C., Cosi, E., & Navari-Izzo, F. (2003). Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol. Plant*, 118, 21-28.
- Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. 17:35–52. *Braz J Plant Physiol*, 17, 35-52.
- Sharma, P., & Pandey, S. (2014). Status of phytoremediation in world scenario. *Int. J. Environ. Biorem. Biodeg*, 2, 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. *J Exp Bot*, 57(4), 711–726.
- Suñe, N., Sánchez-Galván, G., Caffaratti, S., Caffaratti, S., & Maine, M. (2007). Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environmental Pollution*, 145(2), 467-473.
- Tello Zevallos, W., Salvatierra, L., & Pérez, L. (2015). Evaluación de los mecanismos de eliminación de  $Pb^{2+}$  en sistemas de fitorremediación en lotes operados con *Salvinia biloba* Raddi (acordeón de agua). *Energeia*, 13(13), 10-17.
- Torres, G., Navarro, A. E., Languasco, J., Campos, K., & Cuizano, N. A. (2007). Estudio preliminar de la fitorremediación de cobre divalente mediante *Pistia stratiotes* (lechuga de agua). *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3(1), 13-20.

- Tolrá, R. Barceló, J., Poschenrieder, C. (2009). Constitutive and aluminium – induced patterns of phenolic compounds in two maize varieties differing in aluminium tolerance. *J. Inorg. Biochem.* 103: 1486-1490
- Ubillus, L. J. (2003). Estudio sobre la presencia de plomo en el medio ambiente de Talara. Tesis de Bachillerato. Lima, Perú.: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Van der Peck, M. (2006). Soil and Water Contamination: From Molecular to Catchment Scale. Grupo Taylor & Francis Inglaterra:.
- Vidal, M. (2009). Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de plomo (Pb<sup>2+</sup>) en sistemas continuos de fitorremediación con *Salvinia minima*. Veracruz, México.: Tesis de Maestría. Instituto de Ecología.
- Unnikannan, P., Sundaramoorthy, P., Baskaran, L., Sankar Ganesh, K., Chidambaram, A.L.A. (2011). Assessment of chromium phytotoxicity in some aquatic weeds. *Bot. Res. Intl.* 4:13-18
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.
- Wilson, G., & Al-Hamdani, S. (1997). Effect of chromium (VI) and humic substances on selected physiological responses of *Azolla caroliniana*. *Am. Fern. J.*, 87, 17-27.