

Burdisso, M. L. ; Salvatierra, L. M. ; Pérez, L. M.

Desarrollo de una nueva técnica de base colorimétrica para una rápida evaluación de la biodegradabilidad de materiales poliméricos

Energeia, Año 13, N° 13, 2015

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Burdisso, M. L., Salvatierra, L. M., Pérez, L. M. Desarrollo de una nueva técnica de base colorimétrica para una rápida evaluación de la biodegradabilidad de materiales poliméricos [en línea]. *Energeia*, 13(13), 2015. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/revistas/desarrollo-tecnica-colorimetrica-evaluacion.pdf> [Fecha de consulta:]

Desarrollo de una nueva técnica de base colorimétrica para una rápida evaluación de la biodegradabilidad de materiales poliméricos

M. L. Burdisso^{1,2}, L. M. Salvatierra^{3,4}, L. M. Pérez^{1,2,3}

Proyecto “Caracterización experimental y teórica de Biopolímeros y Polímeros de interés tecnológico”

¹ Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Suipacha 531 (2000) Rosario, Argentina

² Instituto de Química Rosario (IQUIR, UNR-CONICET), Suipacha 570 (2000) Rosario, Argentina

³ Facultad de Química e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), Av. Pellegrini 3314 (2000) Rosario, Argentina

⁴ Instituto de Físicoquímica Teórica y Aplicada (INIFTA, UNLP-CONICET), Diag. 113 y 64, 1900, La Plata, Argentina

burdissoluli@gmail.com; lucas_salvatierra@uca.edu.ar; leonardoperez@uca.edu.ar

Resumen. La necesidad de reducir el impacto ambiental causado por el uso de plásticos sintéticos obtenidos a partir de fuentes no-renovables ha motivado el desarrollo de nuevos materiales con carácter biodegradable. Sin embargo, los protocolos internacionales comúnmente utilizados para evaluar la biodegradabilidad de un material son laboriosos y suelen demandar elevados tiempos de procesamiento. En este trabajo, se presentan resultados preliminares obtenidos durante la etapa de desarrollo y puesta a punto de un método rápido, sencillo y eficiente para evaluar el potencial biodegradable de un material plástico, formulado a base de proteínas del lactosuero, utilizando un ensayo colorimétrico indirecto basado en la reducción enzimática de sales de tetrazolio durante el metabolismo aeróbico bacteriano.

Palabras clave. biodegradación de polímeros, método de screening, sales de tetrazolio

Abstract. In the last decades, the need to reduce environmental impact caused by petroleum-based plastics has motivated the development of new bio-based materials with biodegradable properties. However, international standard methods frequently used to assess the biodegradability of plastics require a complicated experimental setup, are time-consuming, and demand months of laborious work. In this article, we show preliminary results of a new, rapid, simple, and efficient method to assess the biodegradability of polymer plastics by using a colorimetric assay based on the enzymatic reduction of tetrazolium salts by the bacterial aerobic metabolism.

Keywords. plastic biodegradability assessment, colorimetric screening method, tetrazolium salts

INTRODUCCIÓN

Una de las características más destacadas de los materiales plásticos es la gran facilidad y economía con la que pueden ser procesados a partir de materias primas convenientemente preparadas. Sin embargo, en su gran mayoría, estas materias primas son derivados de recursos no-renovables provenientes del petróleo. La necesidad de reducir el impacto ambiental causado por el uso de plásticos sintéticos ha motivado el desarrollo de nuevos materiales más sustentables y de carácter biodegradable (Bourtoom, 2008; Javanmard, 2009). Sin embargo, los protocolos internacionales comúnmente utilizados para evaluar la biodegradabilidad de un material son laboriosos y suelen demandar tiempos de procesamiento excesivos (ASTM D 5338, ASTM D 6400). Por lo tanto, es deseable desarrollar nuevas metodologías que permitan detectar rápidamente el potencial biodegradable de un material plástico con el fin de poder tomar decisiones sobre la pertinencia o no de avanzar con los estudios estandarizados.

Ha sido reportado que la reducción de sales de tetrazolio, como el TTC (cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio), durante el metabolismo bacteriano activo puede ser utilizado como una herramienta analítica para cuantificar la viabilidad celular mediante métodos colorimétricos (Berridge *et al.*, 2005). Este indicador redox es reducido por las deshidrogenasas

bacterianas a 1, 3, 5-trifenilformazán de color rojo durante el metabolismo aeróbico como resultado del transporte de electrones; por lo tanto, la cantidad de formazán generado es proporcional a la biomasa bacteriana. Estas técnicas se han utilizado eficientemente para estimar la viabilidad celular y la proliferación de células en suspensión y de comunidades bacterianas en *biofilms* (Hatzinger *et al.*, 2003; Cerca *et al.*, 2005; Peeters *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010), sin embargo, en nuestro conocimiento, su aplicación para el estudio de la capacidad biodegradable de matrices poliméricas aún no ha sido indagado.

En el presente trabajo, se presentan resultados preliminares obtenidos durante la evaluación de la biodegradabilidad de un material bioplástico desarrollado a base de proteínas del lactosuero empleando un método colorimétrico desarrollado por los autores basado en la reducción bacteriana del TTC.

METODOLOGÍA

Materiales

El concentrado de proteínas del lactosuero (WPC 80%) empleado para la elaboración de las matrices bioplásticas fue gentilmente cedido por la empresa Arla Food Ingredients S.A. (Buenos Aires, Argentina). El indicador redox, cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio (TTC), fue provisto por Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los demás reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

Microorganismos

Para llevar adelante los estudios de biodegradación se emplearon las cepas *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, y *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1. Estos microorganismos fueron cedidos por el Área Bacteriología Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Todas las cepas se conservaron a -70 °C en caldo Tripteína Soya (TSB, pH 7,2) conteniendo glicerol (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) al 10% (v/v) como agente crio-protector, y fueron sub-cultivadas durante 16-18 h en caldo TSB (pH 7,2) a 37 °C en un *shaker* con agitación, previamente a su uso.

Preparación de láminas bioplásticas

El material bioplástico a ensayar se preparó a partir de WPC 80% como componente mayoritario y glicerol (Gli) como plastificante siguiendo una modificación de la técnica descrita por Soazo *et al.* (2013). Se disolvieron en 100 mL de agua destilada 10 g de WPC y 5 g de Gli (proporción WPC/Gli 2:1, concentración final de sólidos totales 15% p/v). Luego de agitar la suspensión durante 15 min, se calentó a 90 °C durante 30 min en un baño termostático (TSD-40, Tecno Dalvo, Buenos Aires, Argentina). A continuación, la suspensión se homogeneizó a 20.000 rpm durante 5 min empleando un equipo Omni GLH (Omni International Inc., Warrenton, Estados Unidos). Posteriormente, se colocó en un baño de hielo para detener la desnaturalización proteica y se enfrió hasta temperatura ambiente. Finalmente, se sonicó durante 1 h con el objetivo de promover su desgasificación. El pH final de la suspensión filmogénica resultante fue de 6,4-6,5.

Para la obtención de las láminas (*films*), se pesaron 10 g de suspensión en placas de Petri plásticas de 90 mm de diámetro. Las placas se secaron sobre una superficie nivelada en una cámara ambiental (SCT-Pharma S.A., Buenos Aires, Argentina) bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad relativa (58%). Se efectuó un examen visual periódico de las mismas, y las películas fueron despegadas cuando se observaron signos indicativos de la finalización del proceso de secado. Una vez despegadas de su soporte sólido, se estabilizaron durante 24 h en iguales condiciones a las de secado (25 °C, 58% humedad relativa).

Ensayo de biodegradación

La degradación microbiana del material bioplástico se estudió durante 20 días a 25 °C (agitación 150 rpm). En cada reactor se adicionaron 10 mL de solución salina, 0.5 mg/mL de TTC (cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio) y 105 \pm 5 mg de muestra del material bioplástico (como única fuente de carbono). Posteriormente, cada reactor se inoculó con 100 μ L de una suspensión bacteriana crecida con agitación durante 16-18 h en caldo TSB (pH 7,2) a 37 °C (concentración de inóculo aprox. 2,5 x 10⁷ UFC/mL). Como control positivo del ensayo se utilizó Glucosa al 10% v/v. El TTC es un compuesto incoloro que al entrar en contacto con los microorganismos metabólicamente activos es reducido por las enzimas deshidrogenasas a 1, 3, 5-trifenilformazán de color rojo, cuya absorbancia máxima se encuentra a 476 nm (Berridge *et al.*, 2005). Para determinar la acumulación intracelular del colorante, se tomó 1 mL de muestra de cada reactor a diferentes tiempos de incubación (24 h, 5, 10, 15 ó 20 días).

Las muestras se centrifugaron a 3000g durante 5 min para decantar los microorganismos viables. Luego de eliminar el sobrenadante, se procedió a efectuar la lisis de las células bacterianas con 1 mL de etanol (grado farmacéutico), seguido de un etapa de sonicación durante 10 min. Finalmente, se realizó una segunda centrifugación (5 min., 5000g) con el

objetivo de decantar los restos celulares, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 476 nm empleando un espectrofotómetro Jasco V-530 (Jasco International, Japón). De esta manera, la cuantificación colorimétrica del grado de acumulación intracelular del colorante es proporcional a la cantidad de crecimiento bacteriano, el cual dependerá de la capacidad de los microorganismos para metabolizar el bioplástico. Como control negativo del ensayo se muestrearon reactores sin la adición de fuentes de carbono o con la adición de un plástico no-biodegradable (Parafilm®). Los resultados se informan como el promedio de al menos dos determinaciones.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra una fotografía representativa del material bioplástico obtenido y utilizado en el presente estudio formulado a base de proteínas del lactosuero y glicerol. Como puede apreciarse, estas láminas presentan una coloración ligeramente amarillenta debido a la presencia de lactosa, grasas y fosfolípidos en la composición del WPC (Lorenzen y Schrader, 2006; Ramos *et al.*, 2013). Es de esperar que este material sea biodegradable debido a la elevada concentración en nutrientes de su formulación.



Figura 1. Láminas bioplásticas obtenidas a partir de concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) y glicerol.

En la Figura 2 se observa un control negativo (sin adición de fuente de carbono) y un control positivo (con adición de Glucosa 1%) obtenidos durante las etapas preliminares de desarrollo y puesta a punto de la metodología propuesta en este estudio para evaluar la viabilidad celular empleando el indicador redox TTC. Como puede apreciarse, la coloración rojiza característica del formazán sólo se evidencia cuando en el medio de reacción se adiciona alguna fuente de nutrientes que pueda ser metabolizada por los microorganismos permitiendo su desarrollo aeróbico.



Figura 2. Control negativo (izquierda) y control positivo (derecha) típicos obtenidos en ensayos de determinación de viabilidad celular empleando TTC. Nótese a la derecha la coloración rojiza característica del formazán generada por reducción enzimática del TTC cuando las bacterias crecen en un medio conteniendo Glucosa como fuente de carbono.

En las Figuras 3-6 se muestran diferentes resultados obtenidos durante la evaluación del potencial biodegradable de materiales plásticos enfrentados a distintos microorganismos utilizando el ensayo colorimétrico basado en la reducción de TTC.

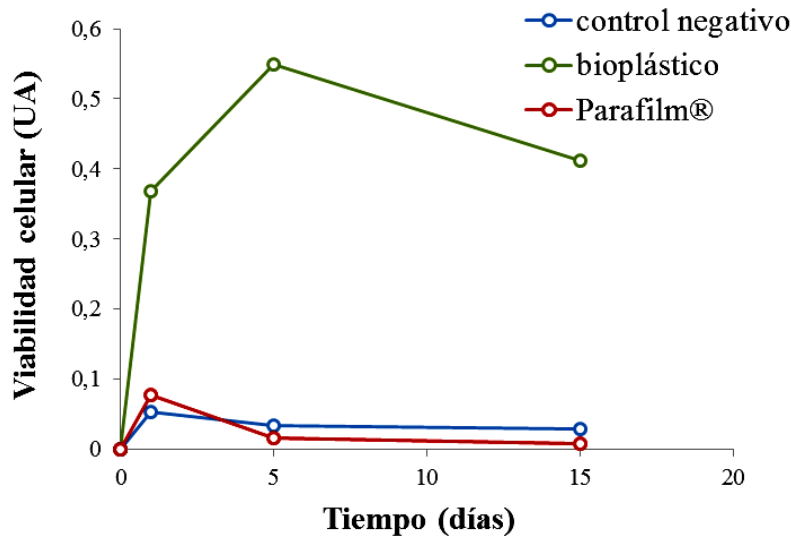


Figura 3. Ensayo de biodegradabilidad de plásticos utilizando la cepa *E. coli* DH5α.

En la Figura 3 se puede evidenciar el claro aumento de la biomasa bacteriana en presencia del bioplástico formulado a base de proteínas del lactosuero. Contrariamente, la adición de un plástico no-biodegradable, como el Parafilm®, imposibilita el crecimiento celular ya que es incapaz de ser utilizado como fuente de nutrientes por las bacterias aeróbicas presentes en el medio de reacción. Como consecuencia, las deshidrogenasas bacterianas se encuentran inactivas reprimiendo la conversión del TTC a formazán.

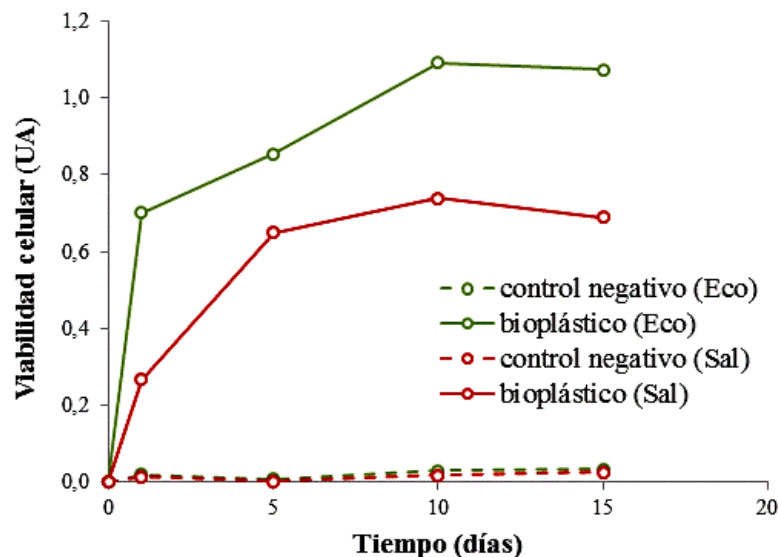


Figura 4. Ensayo de biodegradabilidad de láminas de WPC/Gli utilizando las cepas *E. coli* ATCC25922 (Eco) y *S. typhimurium* ATCC 14028 (Sal).

Es notable destacar que con esta metodología, es posible acceder a un resultado sobre el potencial biodegradable de un material plástico en las primeras 24 h de ensayo. La Figura 4 muestra los resultados obtenidos en estudios similares empleando dos enterobacterias. Nuevamente, la biodegradabilidad de la matriz plástica se manifiesta con el grado de acumulación intracelular del colorante, el cuál es proporcional al incremento de la biomasa bacteriana. Además, es interesante notar que tanto *E. coli* como *S. typhimurium* presentaron un comportamiento similar al utilizar láminas de WPC/Gli como sustrato.

Contrariamente, *S. aureus* presentó un período de latencia, luego del cual se hizo evidente su desarrollo, tanto en presencia de Glucosa como del bioplástico. En este caso, la asimilación de Glucosa como fuente de carbono mostró ser más eficiente (Figura 5) permitiendo un mayor desarrollo de las bacterias en solución.

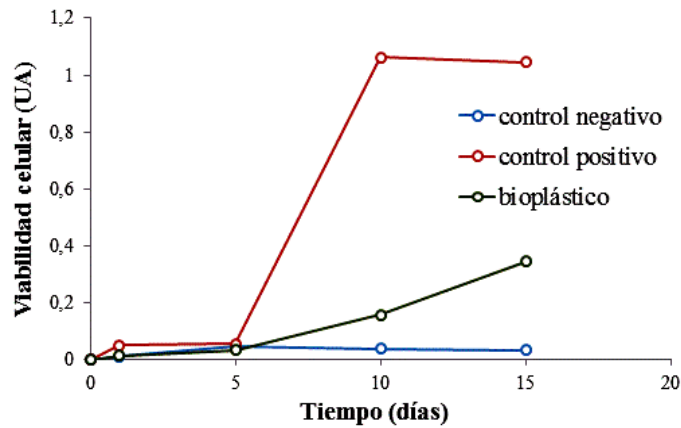


Figura 5. Ensayo de biodegradabilidad de láminas de WPC/Gli utilizando la cepa *S. aureus* ATCC25923.

Los resultados anteriores indican la importancia en la selección de los microorganismos indicadores de biodegradación, ya que cada bacteria posee distintas preferencias nutricionales y puede presentar diferencias metabólicas significativas. Por lo tanto, es interesante la evaluación del microorganismo con el fin de encontrar aquel más adecuado para evidenciar el potencial carácter biodegradable de un material o, a la inversa, utilizar esta metodología para realizar un *screening* en la búsqueda de microorganismos que puedan ser eficientes para degradar un material plástico en particular. Por ejemplo, los resultados mostrados en la Figura 6 sugieren que *Pseudomona aeruginosa* podría ser una bacteria muy eficiente para llevar adelante procesos degradativos de materiales plásticos constituidos a base de polímeros naturales. Los valores de absorbancia relativa alcanzados al emplear *films* de WPC/Gli como fuente de nutrientes superan en un orden de magnitud a los obtenidos para los otros microorganismos ensayados, en iguales condiciones, e incluso con los propios valores de viabilidad alcanzados al utilizar Glucosa como fuente de carbono (control positivo).

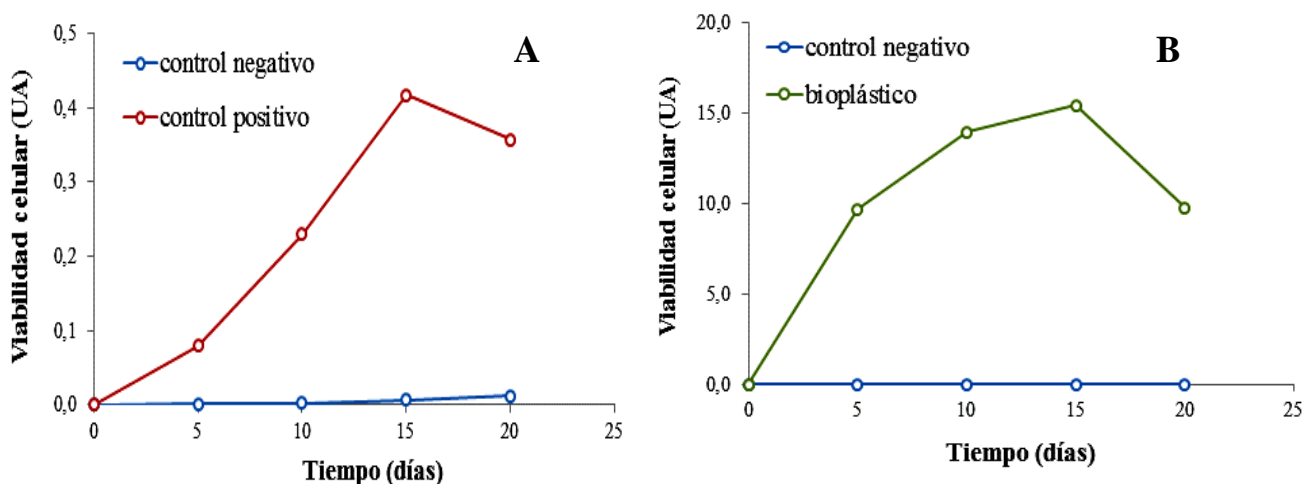


Figura 6. Ensayo de biodegradabilidad de láminas de WPC/Gli utilizando la cepa *P. aeruginosa* PAO-1. Se muestra el desarrollo de *P. aeruginosa* medido como la cantidad de formazán generado (en unidades de absorbancia) creciendo en presencia de A) Glucosa 1% (control positivo) ó B) bioplástico formulado a base de proteínas del lactosuero. Nótese en B) que los valores de viabilidad celular alcanzados superan en un orden de magnitud a los obtenidos en A).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se verificó la factibilidad y pertinencia de la aplicación de una nueva metodología de *screening* basada en la reducción de sales de tetrazolio para evaluar el potencial biodegradable de materiales plásticos. Empleando un polímero formulado a base de proteínas del lactosuero y glicerol contrastado contra un plástico sintético tradicional no-biodegradable se pudo determinar el carácter biodegradable del primero y la incapacidad del segundo para ser utilizado como fuente de nutrientes por diferentes microorganismos. En la mayoría de los ensayos, los resultados obtenidos en tan sólo 24 h pusieron en evidencia el carácter biodegradable o no de estos materiales, alentando la aplicación de este nuevo método para realizar una evaluación preliminar a los estudios normalizados de

biodegradabilidad actuales, más exigentes y laboriosos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la empresa Arla Food Ingredients S.A. (Buenos Aires, Argentina) por su donación de concentrado de proteínas del lactosuero y al Área Bacteriología Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario, Argentina) por facilitar los microorganismos utilizados en los ensayos de biodegradación. También queremos expresar nuestro agradecimiento a la Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Provincia de Santa Fe (SECTeI), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), a la Universidad Nacional de Rosario (UNR) y a la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA, sede Rosario) por los fondos suministrados para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- ASTM D 5338 (1998). Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM D 6400 (1999). Standard specification for compostable plastics. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Berridge, M.V.; Herst, P.M.; Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.*, 11, 127-152.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int. Food Res. J.*, 15, 237-248.
- Cerca, N.; Martins, S.; Cerca, F.; Jefferson, K.K.; Pier, G.B.; Oliveira, R.; Azeredo, J. (2005). Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56, 331-336.
- Hatzinger, P.B.; Palmer, P.; Smith, R.L.; Peñarrieta, C.T.; Yoshinari, T. (2003). Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 52, 47-58.
- Javanmard, M. (2009). Biodegradable whey protein edible films as a new biomaterials for food and drug packaging. *Iranian J. Pharm. Sci.*, 5, 129-134.
- Lorenzen, P.C.; Schrader, K. (2006). A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Le Lait*, 86, 259-271.
- Peeters, E.; Nelis, H.J.; Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods*, 72, 157-165.
- Pérez, L.M.; Álvarez, B.L.; Codony, F.; Fittipaldi, M.; Adrados, B.; Peñuela, G.; Morató, J. (2010). A new microtiter plate screening method for evaluating the viability of aerobic respiring bacteria in high surface biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.*; 51, 331-337.
- Ramos, O.L.; Reinas, I.; Silva, S.I.; Fernandes, J.C.; Cerqueira, M.A.; Pereira, R.N.; Vicente, A.A.; Poças, M.F.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocol.*, 30, 110-122.
- Soazo, M.; Pérez, L.M.; Rubiolo, A.C.; Verdini, R.A. (2013). Effect of freezing on physical properties of whey protein emulsion films. *Food Hydrocol.*, 31, 256-263.

Evaluación de los mecanismos de eliminación de Pb^{2+} en sistemas de fitorremediación en lotes operados con *Salvinia biloba raddi* (acordeón de agua)

W. Tello Zevallos¹, L. M. Salvatierra^{1,2}, L. M. Pérez^{1,3}

Proyecto “Estudio de las propiedades de la vegetación nativa aplicables a la biorremediación”

¹ Facultad de Química e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), Av. Pellegrini 3314 (2000) Rosario, Argentina

² Instituto de Físicoquímica Teórica y Aplicada (INIFTA, UNLP-CONICET), Diag. 113 y 64, 1900, La Plata, Argentina

³ Instituto de Química Rosario (IQUIR, UNR-CONICET), Suipacha 570 (2000) Rosario, Argentina

lucas_salvatierra@uca.edu.ar; leonardoperez@uca.edu.ar

Resumen. La fitorremediación es una tecnología sostenible y ambientalmente pertinente que ha resultado útil como método alternativo a las tecnologías convencionales para el tratamiento de aguas residuales e industriales. Los sistemas basados en la utilización de plantas acuáticas han demostrado ser altamente eficientes para eliminar metales pesados. Numerosos estudios han sugerido que la adsorción superficial y la acumulación intracelular son los principales mecanismos involucrados en la eliminación de metales pesados por distintas especies de *Salvinia*. Sin embargo, estos estudios no se han ampliado a *Salvinia biloba Raddi*, una especie que crece en forma muy abundante en las costas santafesinas. Si bien ha sido demostrado que ciertas especies de este helecho acuático tienen el potencial para hiperacumular Pb^{2+} , es necesario generar más conocimiento para entender los mecanismos básicos participantes en la biorremediación de este metal. El presente trabajo pretende contribuir al entendimiento de estos fenómenos en *Salvinia biloba Raddi*, y podrían ser útiles para ser aplicados a la optimización de fitotecnologías orientadas al tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados.

Palabras clave: fitorremediación de aguas contaminadas; metales pesados; *Salvinia biloba Raddi*; plomo.

Abstract. Phytoremediation is an environmentally sound technology that has been shown to be very efficient for wastewater remediation. Treatment systems using aquatic plants have proved to be efficient to remove several contaminants including metals. Previous research has suggested that superficial adsorption and intracellular accumulation are the main mechanisms involved in heavy metals removal from polluted waters in *Salvinia* species. However, no studies have been done on the phytoremediation potential of *Salvinia biloba Raddi*, a prolific aquatic plant frequently encountered in many Argentinian coasts. Although, other *Salvinia* species showed to be lead (Pb^{2+}) hyperaccumulator more information is required to understand the basic mechanisms involved in heavy metal bioremediation in other plants of this type. This work is a contribution to understand some factors and mechanisms involved in Pb^{2+} removal by *Salvinia biloba Raddi*, which will be very useful for the optimization of phytotechnologies using hyperaccumulating plants.

Keywords: polluted water phytoremediation; heavy metals; *Salvinia biloba Raddi*; lead.

INTRODUCCIÓN

Los metales son contaminantes ubicuos que han acompañado al hombre desde la antigüedad. Estos elementos están sujetos, de forma natural, a diferentes ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los suelos, aguas subterráneas y superficiales, en el aire y en los seres vivos. La actividad industrial, producto de la intervención humana, es capaz de modificar sustancialmente la concentración y la distribución de los metales en el medio ambiente (Peng *et al.*, 2008). Algunos de estos compuestos han sido categorizados como contaminantes prioritarios por la

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Entre ellos, el plomo (Pb), el mercurio (Hg), el arsénico (As) y el cadmio (Cd) están clasificados como los elementos de mayor riesgo en la lista de la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades de los Estados Unidos (ATSDR) (Rai, 2008). Si bien, ciertos metales son fundamentales para algunos procesos metabólicos en diferentes organismos, cuando se hayan en exceso pueden ser altamente citotóxicos, cancerígenos y mutagénicos (Prasad *et al.*, 2003).

El Pb^{2+} es uno de los metales pesados más abundantes y más ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Las principales fuentes de dispersión de Pb^{2+} han sido las fundiciones, su antigua presencia como aditivo en pinturas, gasolina para automóviles, baterías ácidas, plaguicidas, fertilizantes, y a causa de la actividad minera. Más recientemente, las preocupaciones concernientes a su control han estado vinculadas a su persistencia como residuo en el polvo urbano de las ciudades, a fugas e impacto a nivel de cursos de ríos y aguas subterráneas producto de las lluvias y de la escorrentía agrícola, y a su incorporación en la cadena trófica a través de cultivos contaminados con Pb^{2+} (Marmioli *et al.*, 2005).

Actualmente, la gestión integrada de los recursos hídricos, así como la restauración de áreas ambientalmente degradadas, han impulsado la demanda por el desarrollo de nuevas tecnologías orientadas a la remoción de contaminantes y a la minimización del impacto ambiental causado por diferentes residuos y compuestos tóxicos liberados en los efluentes industriales. La fitorremediación es una tecnología sostenible y ambientalmente pertinente que ha resultado muy útil como método alternativo a las tecnologías tradicionales para el tratamiento de aguas contaminadas. En particular, los sistemas basados en la utilización de plantas acuáticas del género *Salvinia* han demostrado ser altamente eficientes para eliminar metales en diferentes muestras de aguas (Dhir, 2009). Sin embargo, no se han reportado estudios sobre la capacidad hiperacumuladora de metales pesados en *Salvinia biloba* Raddi, una especie que se encuentra presente de manera muy abundante en los humedales de las costas santafesinas.

Por lo tanto, el presente estudio pretende evaluar la capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para eliminar Pb^{2+} en muestras de aguas contaminadas artificialmente, ahondando en los mecanismos subyacentes involucrados en el proceso de fitorremediación de metales pesados característico de esta especie vegetal.

METODOLOGÍA

Recolección de plantas acuáticas y caracterización de la especie vegetal

Las plantas acuáticas utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas en la zona del Río Paraná Medio (litoral santafesino), siendo identificadas inicialmente como pertenecientes al género *Salvinia* de acuerdo a su aspecto y características morfológicas. Las especies seleccionadas fueron trasladadas al laboratorio conservándose a temperatura ambiente en un recipiente conteniendo agua de los humedales del cual fueron extraídas. La clasificación final en especie se realizó mediante estudios taxonómicos llevados a cabo en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina). Los ejemplares remitidos al IBONE fueron examinados con las claves dicotómicas publicadas por De la Sota (1962; 1976a,b; 1977; 1982) resultando su clasificación como pertenecientes a la especie *Salvinia biloba* Raddi (Fig. 1). Estos especímenes fueron depositados en el herbario Carmen Cristóbal del IBONE para ser utilizados como ejemplares testigos para futuras investigaciones.



Figura 1. *Salvinia biloba* Raddi (acordeón de agua). Las plantas fueron recolectadas en las costas del Río Paraná lindantes a la Ciudad de Rosario.

Cultivo de plantas acuáticas

Los especímenes de *Salvinia biloba* Raddi fueron lavados con agua potable para eliminar todo tipo de residuo contaminante que pudiera interferir con el estudio (Torres y col., 2007). Posteriormente, se cultivaron en recipientes de vidrio manteniéndose en un espacio adecuado a temperatura ambiente con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas. Periódicamente, se realizó el recambio del agua de los recipientes de cultivo evaluándose el estado de las plantas. En caso de presentar signos visibles de tejido dañado o deteriorado se procedió al descarte del ejemplar (Sánchez, 2008).

Evaluación de la capacidad fitorremediadora

Con el objetivo de evaluar la capacidad de *Salvinia biloba* Raddi para eliminar Pb^{2+} en una muestra de agua sintética se establecieron diferentes unidades experimentales empleando recipientes de vidrio de 1,5 L de capacidad a los cuales se les adicionó 20,0 g de biomasa vegetal húmeda. A partir de una solución patrón de $Pb(NO_3)_2$ 1000 mg/L (ppm) se realizaron diluciones adecuadas para obtener una concentración final de Pb^{2+} en cada recipiente correspondiente a 5, 10, ó 20 ppm. Para cada concentración se instalaron 7 unidades experimentales de manera de establecer un sistema de trabajo en lotes. Adicionalmente, se incluyeron dos tipos de controles. El primero consistió en evaluar la posible adsorción del metal a la superficie del recipiente. Para ello, se dispuso una unidad experimental sin biomasa conteniendo el metal a la concentración inicial del tratamiento. El segundo control se utilizó para descartar la presencia de Pb^{2+} en las plantas para lo cual se reservó un recipiente conteniendo sólo biomasa sin la presencia del metal en el medio. En todos los ensayos, y para todos los grupos experimentales, la temperatura de trabajo se mantuvo constante ($23 \pm 2^\circ C$).

El estudio de los mecanismos involucrados en la fitorremediación de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Raddi se realizó mediante un análisis de compartimentalización de acuerdo al trabajo de Olguín y col. (2005). Estos autores definen tres sitios donde el metal puede ser encontrado: 1) en la columna de agua, 2) en la biomasa vegetal adsorbido a su superficie y, 3) en la biomasa vegetal acumulado intracelularmente. Para cuantificar el contenido de metal en la columna de agua se tomaron muestras a tiempo 0, 1/2, 2, 4, 6, 12 y 24 h. Las muestras de agua se analizaron por espectroscopia de absorción atómica utilizando un equipo Varian AA240FS (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) según el procedimiento descrito en las normas APHA (1998). La cuantificación del contenido de Pb^{2+} en la biomasa vegetal se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Olguín y col. (2005) con leves modificaciones. Brevemente, a cada tiempo de exposición se retiró la biomasa vegetal de su recipiente y se la enjuagó con agua desionizada. Posteriormente, se realizó un lavado con 400 mL de una solución de EDTA 0,0017 M durante 1 h con agitación orbital a 180 rpm con el objetivo de secuestrar por complejación el Pb^{2+} adsorbido superficialmente a las raíces de las plantas. A continuación, las muestras de biomasa se lavaron con 400 mL de agua desionizada, con agitación suave, para eliminar el exceso de EDTA. Finalmente, el contenido de metal se cuantificó en ambas aguas de lavado por espectroscopia de absorción atómica.

La cuantificación de la cantidad de Pb^{2+} acumulado intracelularmente se realizó sobre una porción de materia vegetal previamente secada en una estufa de cultivo a $80^\circ C$ hasta peso constante. Para ello, 0,1 g de biomasa seca se dejó reposar durante 12 h con 10 mL de ácido nítrico concentrado (grado reactivo). Posteriormente, la muestra se colocó en un bloque de digestión a una temperatura de $120^\circ C$ durante 2 h hasta la desaparición de vapores pardos. Finalmente, el contenido de Pb^{2+} intracelular en las muestras digeridas se analizó espectrofotométricamente de manera análoga a la descrita anteriormente. Adicionalmente, se determinó el porcentaje de humedad de cada muestra de biomasa a través de la determinación gravimétrica de la pérdida de agua por calentamiento hasta peso constante. Este dato se utilizó para corregir la concentración de Pb^{2+} intracelular.

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Sigma-Stat® (Versión 3.1, Systat Software Inc., USA). Se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) para la comparación entre distintos factores. Cuando los efectos fueron significativos ($p < 0,05$) se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (con un intervalo de confianza del 95%).

RESULTADOS

En la Figura 2 se muestran las curvas de eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua obtenidas en ensayos independientes para las tres concentraciones del metal analizadas (5, 10 y 20 ppm). Como puede evidenciarse, existe una correlación positiva entre la cantidad de metal removido de la columna de agua respecto del tiempo de exposición a la biomasa vegetal; es decir, a medida que se incrementa el tiempo de exposición, aumenta la cantidad de metal eliminado. Notablemente, más del 90% del contaminante es removido a las 24 h de ensayo, en todas las concentraciones analizadas (Fig. 3). Resultados similares, empleando concentraciones análogas a las utilizadas en el presente estudio, habían sido reportados previamente para otras especies del *Salvinia* (Olguín *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2008; Dhir, 2009) demostrando su capacidad para hiperacumular Pb^{2+} . Nuestros resultados sustentan estas observaciones, ampliando el espectro de especies nativas de *Salvinia* con potencial para ser empleadas en el desarrollo de fitotecnologías orientadas a la remoción de metales pesados.

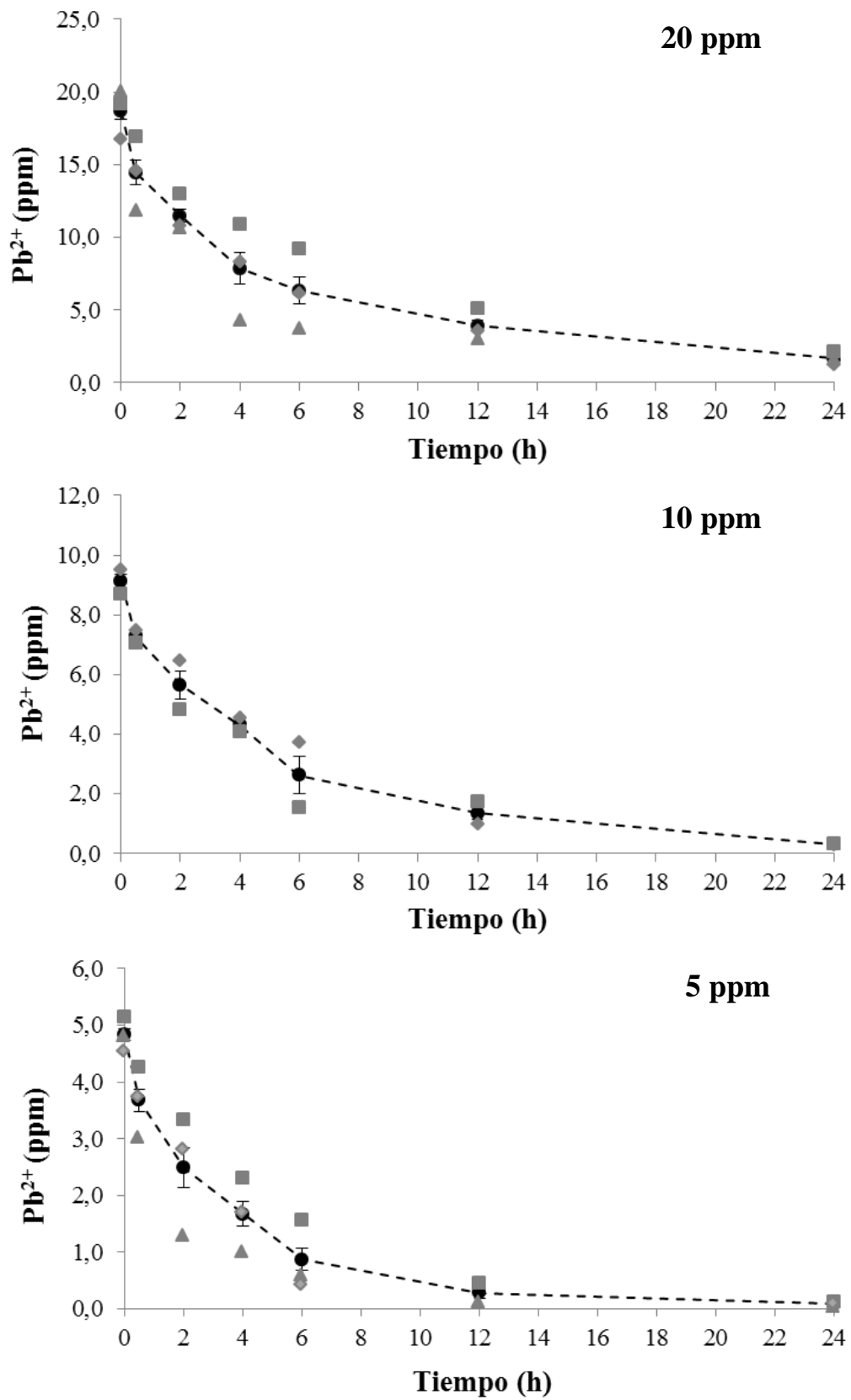


Figura 2. Fitorremediación de aguas contaminadas con Pb^{2+} empleando sistemas en lotes operados con *Salvinia biloba* Radii. Los puntos grises corresponden a los valores obtenidos en ensayos independientes. Los puntos negros corresponden al promedio \pm error estándar para cada tiempo.

La Figura 3, muestra el porcentaje (%) de remoción de Pb^{2+} en función del tiempo de exposición a *Salvinia biloba* Radii. Como puede observarse, para una concentración inicial de Pb^{2+} en agua de 5 ppm, el 50% de remoción se logra en las primeras 2 h; mientras que para concentraciones superiores (10 y 20 ppm) se requiere aproximadamente del doble de tiempo (*i.e.*, 4 hs) para lograr el mismo porcentaje de remoción. Algo similar ocurre para alcanzar una remoción del 80%; para una concentración inicial de Pb^{2+} en agua de 5 ppm se necesitan 6 hs mientras que este tiempo se duplica cuando la concentración inicial del metal es de 10 ppm. Estas observaciones ponen en evidencia la existencia de una correlación negativa entre la concentración inicial del metal en el agua y el tiempo de exposición requerido para su eliminación, siendo este fenómeno más notorio en las primeras horas del ensayo.

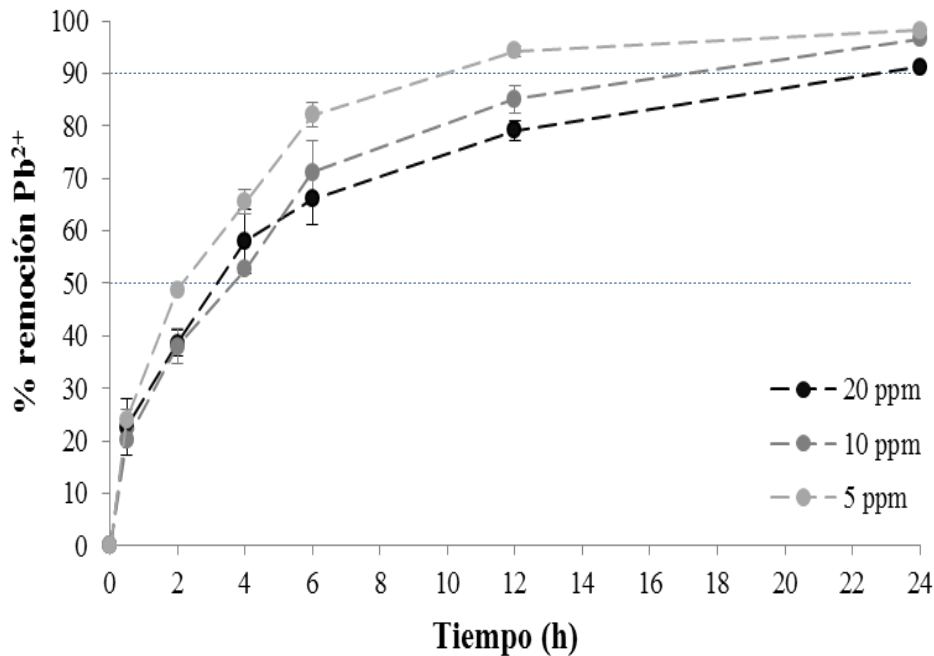


Figura 3. Porcentaje (%) de remoción de Pb^{2+} en agua sintética contaminada artificialmente empleando sistemas en lotes operados con *Salvinia biloba* Radii. Los valores representados corresponden al promedio de tres determinaciones \pm error estándar.

Si bien, al final del período de evaluación (24 h) los porcentajes de remoción alcanzados fueron muy satisfactorios para todas las concentraciones iniciales ensayadas, el porcentaje de remoción logrado con 20 ppm de Pb^{2+} ($91,2 \pm 1,9\%$) fue significativamente menor ($p < 0,05$) que el alcanzado con 5 ($98,2 \pm 0,8\%$) y 10 ppm ($96,6 \pm 0,5\%$). Es interesante notar que en trabajos similares utilizando otras plantas acuáticas flotantes como las lemnáceas y bajo condiciones experimentales análogas, se han encontrado menores porcentajes de eliminación de Pb^{2+} . Por ejemplo, Hurd y Sternberg (2008) reportaron una eliminación cercana al 86% en un período de 24 h en un sistema por lotes utilizando *Lemna minor* a una concentración inicial de Pb^{2+} de 5 mg/l. En este trabajo, se obtuvo una eliminación 12% mayor ($98,2 \pm 0,8\%$) del metal en la columna de agua para una concentración inicial similar.

Una vez evaluada la eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua, se procedió a determinar la distribución del metal en la planta a través de un análisis de compartimentalización. Para ello, se definieron 3 destinos o compartimentos probables para encontrar el metal durante el proceso de fitorremediación: 1) Pb^{2+} remanente en la columna de agua, 2) Pb^{2+} adsorbido a la superficie de la biomasa vegetal, 3) Pb^{2+} acumulado intracelularmente.

Los resultados de la figura 4 muestran la distribución del metal en los diferentes compartimentos a medida que avanza el proceso de remediación. Como puede observarse, la sumatoria de las concentraciones de Pb^{2+} halladas en los diferentes destinos permiten recuperar el 100% de metal adicionado al comienzo del ensayo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los dos mecanismos principales involucrados en la remoción de Pb^{2+} por *Salvinia biloba* Radii son la adsorción superficial y la acumulación intracelular, en analogía con lo reportado previamente para otras especies de *Salvinia* (Olguín et al., 2005).

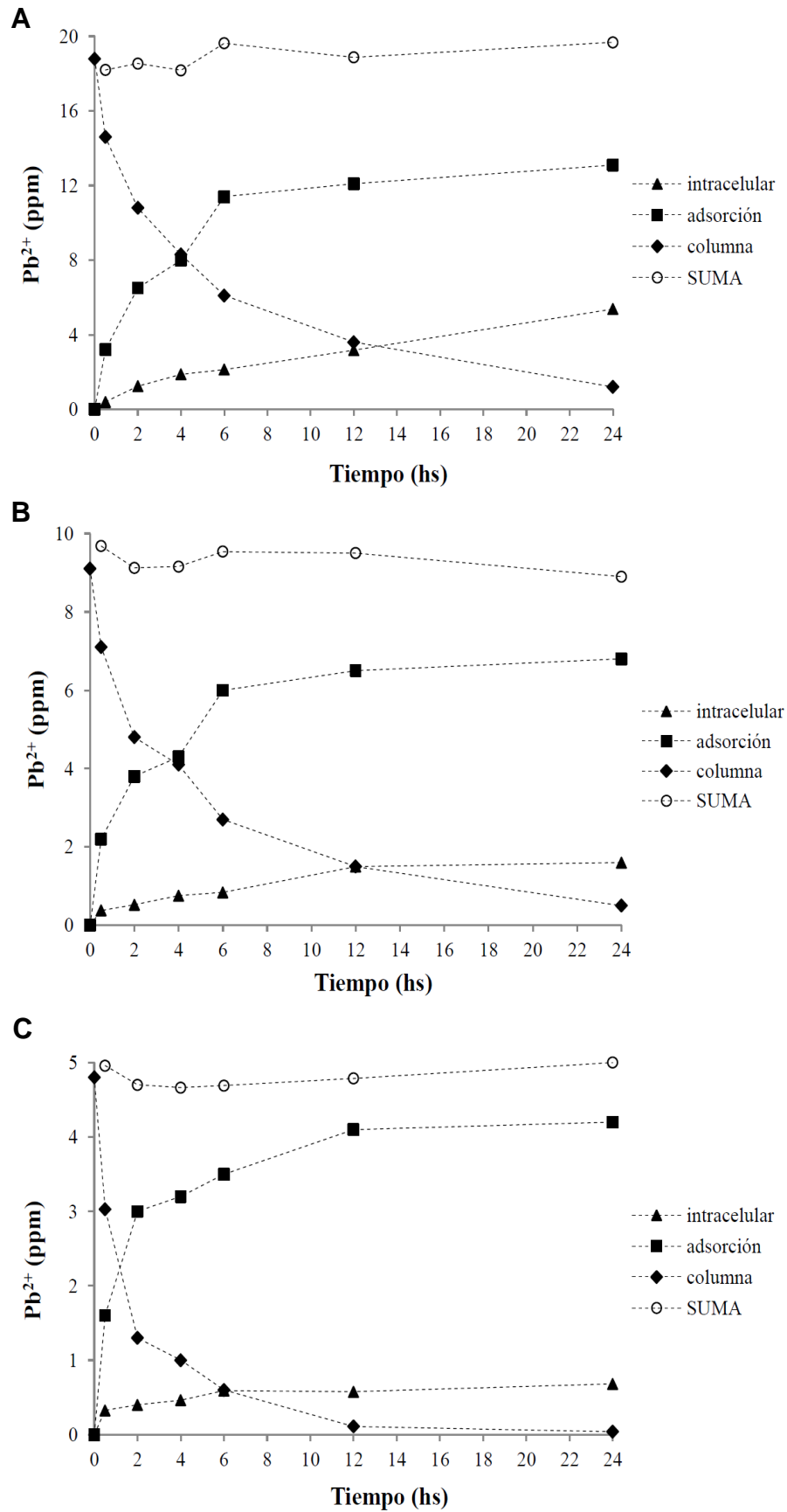


Figura 4. Estudios de compartimentalización en *Salvinia biloba* Radii. Las curvas muestran la distribución de Pb^{2+} en los tres compartimentos definidos (columna de agua, adsorción superficial o espacio intracelular) para las distintas concentraciones iniciales del metal ensayadas: A) 20 ppm; B) 10 ppm y C) 5 ppm.

Los resultados obtenidos a las 24 h mostraron claramente que la mayor cantidad de Pb^{2+} eliminado de la columna de agua se encontró adsorbido a la superficie de la biomasa en todas las concentraciones evaluadas y a todos los tiempos de exposición. Por el contrario, una menor proporción del metal se acumuló en el interior celular (Fig. 5).

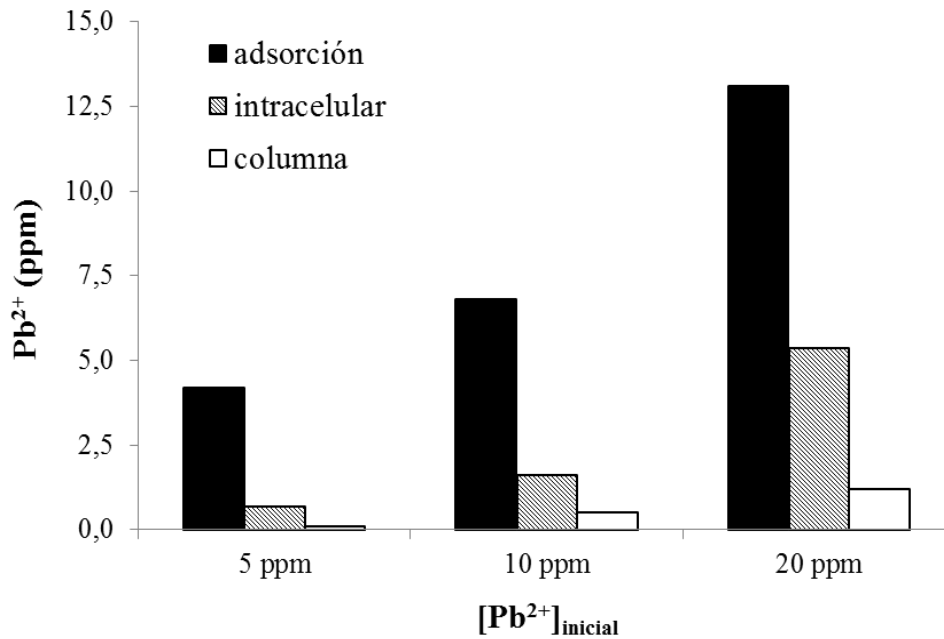


Figura 5. Distribución del contenido de Pb^{2+} en los tres compartimentos definidos al tiempo final del ensayo (24 h) para las distintas concentraciones iniciales del metal ensayadas.

El modo de captación del metal en los procesos de fitorremediación con plantas acuáticas varía dependiendo de la especie vegetal y del metal. La biorremediación de metales pesados en *Salvinia*, y su compartimentación, dependen principalmente de la presencia de ciertos nutrientes y agentes quelantes, hecho que corresponde a diferentes condiciones ambientales (Olguín et al., 2005). La eliminación de metales en *Salvinia* se produce a través de un mecanismo físico y otro biológico. El primer mecanismo es la adsorción superficial, el cual es un proceso físico, rápido, reversible, e implica fenómenos de adherencia, intercambio iónico y complejación. El segundo mecanismo es un proceso biológico de captación intracelular del metal por medio de un transporte activo a través de la membrana plasmática de las células y es comparativamente más lento (Suñe et al., 2007).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó, por primera vez, la eficiencia de eliminación de Pb^{2+} en un modelo de sistema de fitorremediación en lotes utilizando *Salvinia biloba* Raddi. Esta especie mostró ser muy eficiente para remover el metal de la columna de agua aún a la concentración más elevada de 20 ppm, mostrando en tan sólo 24 h un porcentaje de remoción de Pb^{2+} de entre $91,2 \pm 1,9\%$ a $98,2 \pm 0,8\%$. A partir de los resultados de los estudios de compartimentalización efectuados en *Salvinia biloba* Raddi se pudo demostrar que los principales mecanismos involucrados en este proceso son la adsorción superficial y la acumulación intracelular del metal. Estos resultados contribuyen al entendimiento de los fenómenos de biorremediación utilizando diferentes especies de *Salvinia*, y podrían ser útiles en el desarrollo y optimización de fitotecnologías orientadas al tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer especialmente a la Facultad de Química e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica Argentina, campus Rosario, por los fondos suministrados para la realización del presente trabajo; y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). W. T. Z desea agradecer personalmente al Ministerio de Educación de la República de Perú, a través de su Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (Pronabec).

REFERENCIAS

- APHA. American Public Health Association (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed.
- De la Sota, E.R. (1962). Contribución al conocimiento de las Salviniaceae neotropicales. *Darwiniana*, 12(3): 465-520.
- De la Sota, E.R. (1976a). Sinopsis de las especies argentinas del género *Salvinia* Adanson (Salviniaceae-Pteridophyta). *Bol. Soc. Arg. Bot.*, 17(1-2): 47-50.
- De la Sota, E.R. (1976b). Sinopsis de las Pteridófitas del Noroeste de Argentina III. *Darwiniana*, 20(1-2): 225-232.
- De la Sota, E.R. (1977). Índice sistemático y bibliográfico de los taxa vivientes del género *Salvinia* Adanson (Salviniaceae-Pteridophyta). *Obra Centenario, Museo de La Plata. III. Bor.*: 229-235.
- De la Sota, E.R. (1982). Sobre *Salvinia radula* Baker (Salviniaceae-Pteridophyta). *Biotica*, 7(3): 457-462.
- Dhir, B. (2009). *Salvinia*: an aquatic fern with potential use in phytoremediation. *Environ. We Int. J. Sci. Tech.*, 4: 23-27.
- Hurd, N.A., Sternberg, S.P.K. (2008). Bioremoval of aqueous lead using *Lemna minor*. *Int. J. Phytorem.*, 10(4): 278-288.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., Marmioli, N. (2005). Evidence of the involvement of plant lignocellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environ. Poll.*, 134: 217-227.
- Olguín, E.J., Sánchez, G., Pérez, T., Pérez, A. (2005). Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb (II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 32(11-12): 577-586.
- Peng, K., Luo, C., Lou, L., Li, X., Shen, Z. (2008). Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment. *Sci. Total Environ.*, 392: 22-29.
- Prasad, M.N.V. (2003). Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization. *Russ. J. Plant Physiol.*, 50(5): 686-700.
- Rai, P.K. (2008). Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: an ecosustainable approach. *Int. J. Phytoremediat.*, 10: 133-160.
- Sánchez, G., Monroy, O., Gómez, J., Olguín, E.J. (2008). Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors. *Water Air Soil Poll.*, 194(1-4): 77-90.
- Suñe, N., Sánchez, G., Caffaratti, S., Maine, M.A. (2007). Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ. Poll.*, 145: 467-473.
- 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). *Rev. Lat. Rec. Nat.*, 3(1): 13-20.