

Caracterización de los mecanismos de fitorremediación de *Salvinia* sp. frente a la exposición a metales pesados y su impacto sobre la fisiología vegetal.

Wendi Llatance Oyarce^{1,2}, Julia Emiliani¹, Daniela Bergara¹, Lucas Salvatierra^{1,3}, Leonardo Pérez^{1,3}

¹ Grupo de Biotecnología de Materiales y Medioambiente (Bio&TecMA), Depto. de Investigación Institucional, Facultad de Química e Ingeniería del Rosario, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), Rosario, Argentina.

² Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), Chachapoyas, Perú.

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina.

Resumen:

Los metales pesados son ampliamente reconocidos como uno de los contaminantes más relevantes en aguas residuales industriales, principalmente debido a sus elevados tiempos de residencia, ya que a diferencia de los contaminantes de tipo orgánico, estas sustancias no pueden ser química ni biológicamente degradadas. La fitorremediación es una de las aplicaciones biotecnológicas más difundidas a nivel global, que consiste en la utilización de biomasa vegetal para adsorber y/o acumular una gran variedad de contaminantes químicos presentes en el suelo, el agua o el aire. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de macrófitas acuáticas autóctonas del género *Salvinia* para remover, en forma independiente, iguales concentraciones (50 ± 2 y 100 ± 1 μM) de Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Plomo (Pb) o Zinc (Zn) en muestras de agua contaminada artificialmente, durante 48 h. Paralelamente, se analizó el efecto fitotóxico de la exposición a estos metales sobre la fisiología de las plantas. Nuestros resultados demostraron que *S. biloba* posee la capacidad para bioconcentrar los metales ensayados con diferente afinidad. Además, los mecanismos de captación y desintoxicación fueron distintos para cada metal, resultando mayor la eficiencia de remoción para Cu y Pb, respecto de la hallada para Cd y para Zn. Por su parte, los parámetros fisiológicos analizados en las hojas flotantes de *S. biloba* resultaron diferencialmente afectados, demostrando que los mecanismos de respuesta desarrollados por estas macrófitas son diferentes para cada uno de los metales analizados.

Palabras claves: Fitorremediación, metales pesados, cadmio, cobre, plomo, zinc, macrófitas autóctonas, *Salvinia* sp.

Abstract:

Heavy metals are highly recognized as pollutants in industrial wastewater mainly due to their long residence times since these substances cannot be chemically or biologically degraded. Phytoremediation is one of the most widespread biotechnological applications worldwide, which consists in the use of plant biomass to adsorb or accumulate a wide range of chemical contaminants from soil, water or air. In the present work, we have evaluated the capacity of native aquatic macrophytes of the genus *Salvinia* to independently remove equal concentrations (50 ± 2 and 100 ± 1 μM) of Cadmium (Cd), Copper (Cu), Lead (Pb) or Zinc (Zn) from artificially contaminated water samples during 48 h. Additionally, heavy metals phytotoxicity in floating leaves of *Salvinia* specimens were also evaluated. Our results showed that *Salvinia* sp. were able to bioconcentrate all the metals analyzed with different affinity. In addition, the mechanisms of uptake and detoxification were different for each metal, resulting in a greater removal efficiency for Cu and Pb, compared to the found for Cd and Zn. On the other hand, physiological parameters of floating leaves were differentially affected, demonstrating that different response mechanisms are developed by *Salvinia* sp. to counteract the toxicological effect during heavy metals phytoremediation.

Keywords: Phytoremediation, heavy metals, cadmium, copper, lead, zinc, autochthonous free-floating macrophytes, *Salvinia* sp.

1. Introducción

La contaminación ambiental con metales pesados es un problema vigente a nivel global ocasionado por el constante crecimiento de la industrialización y la urbanización. Uno de los problemas más relevantes de la contaminación con metales pesados es su persistencia en el ambiente dada su naturaleza no biodegradable (Azimi y col, 2017). Por lo tanto, la eliminación de estas sustancias en los depósitos de agua dulce debe ser abordada con estrategias seguras y eficientes, sobre todo para aquellas sustancias asociadas con un importante grado de ecotoxicidad y elevada capacidad para acumularse en los organismos vivos, tales como el mercurio (Hg), el cadmio (Cd), el cromo (Cr), el arsénico (As) y el plomo (Pb) (Pourrut y col, 2011; Alloway, 2013; Mishra y col, 2014; Li y col, 2015; Wang y col, 2015). Por el contrario, otros elementos metálicos tales como el manganeso (Mn), níquel (Ni), cobre (Cu), hierro (Fe) y Zinc (Zn) son

micronutrientes (*i.e.*, elementos esenciales para el metabolismo de los organismos vivos); sin embargo, cuando están presentes en concentraciones elevadas o su exposición es prolongada, también pueden inducir efectos nocivos, tanto en plantas como en animales (Efroymsen y col, 1997; Marschner, 1998; Haslett y col, 2001; Rascio y col, 2011; Molinari y col, 2015).

En la actualidad, existen diferentes tecnologías para la eliminación de iones metálicos en aguas residuales e industriales, entre ellas se incluyen métodos tradicionales, tales como la precipitación química, tecnologías de filtración por membranas, extracción con solventes orgánicos, intercambio iónico y procesos de adsorción sobre materiales inertes (Azubuike y col, 2016), y métodos no convencionales como la fitorremediación, siendo esta última una tecnología reconocida por ser más sustentable, económica y especialmente eficiente cuando se aplica a la remediación de grandes volúmenes (Barakat, 2011; Dixit y col., 2015, Azubuike y col, 2016).

En la Argentina, particularmente sobre los márgenes del Río Paraná, existe una extensa y abundante zona de humedales, cuya variada vegetación posee un gran potencial para la captación de contaminantes y que podría utilizarse para la eliminación de diferentes sustancias tóxicas en sistemas artificiales, o como bioindicadores de la contaminación (Wolf y col, 2012; Alonso y col, 2018; Tello Zevallos y col, 2018, Castillo Loría y col, 2019). Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la capacidad fitorremediadora de macrófitas autóctonas del género *Salvinia* para eliminar Cd, Pb, Cu y Zn en muestras de aguas contaminadas artificialmente con distintas concentraciones de cada metales, en forma independiente. Adicionalmente, se realizaron estudios de compartimentalización con el fin de dilucidar los diferentes mecanismos involucrados en el proceso de remediación y la respuesta fisiológica de las plantas seleccionadas frente al estrés abiótico provocado por la exposición metales pesados.

2. Materiales y Métodos

2.1. Obtención del material vegetal.

Los especímenes de *Salvinia* sp. se colectaron en 3 etapas (durante los meses de Febrero, Marzo y Abril de 2019) a orillas de una laguna localizada en el parador conocido como “Isla Verde”, ubicado entre la playa de “La Florida” y la cabecera del puente Rosario-Victoria (latitud 32°52’35” Sur y longitud 60°40’33” Oeste, Entre Ríos, Argentina), en analogía con otras muestras utilizadas en investigaciones previas del grupo (Tello Zevallos y col, 2018, Castillo Loría y col, 2019). Los mismos se colectaron en un recipiente plástico, junto con agua del sitio para mantener las características de su ambiente. Luego, se trasladaron a la planta piloto de la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA-Rosario), donde fueron lavados con abundante agua de grifo y conservados a temperatura ambiente en peceras de vidrio. Los ensayos experimentales se realizaron en vasos de precipitado de 600 mL, los cuales fueron incubados bajo luz blanca controlando el fotoperíodo de luz/oscuridad ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 14 h luz y 10 h oscuridad).

2.2. Cuantificación de los metales en la columna de agua.

La concentración residual en la columna de agua de los diferentes metales analizados se realizó por espectroscopia de absorción atómica (EAA) empleando un equipo Varian® AA240FS, según el procedimiento descrito por Castillo Loria y col. (2019). Para cada metal, se realizó previamente una curva de calibración con soluciones patrones de Cd (0,6-3 ppm), Cu (0,4-7 ppm), Pb (1-5 ppm) y Zn (0,075-1,4 ppm) preparadas en agua acidulada (HNO_3 cc. 0,15%).

2.3. Determinación de la capacidad fitorremediadora de *Salvinia* sp.

La capacidad de *Salvinia* sp. para remover cada uno de los metales en forma independiente se evaluó en muestras de agua contaminada artificialmente con 50 ± 2 o $100 \pm 1 \mu\text{M}$ de Cd, Cu, Pb o Zn. Para cada ensayo se utilizaron 5 unidades experimentales compuestas por un grupo “Control” y un grupo “Muestra” para cada uno de los metales. El ensayo experimental fue realizado por duplicado ($n=2$). Cada unidad experimental consistió de 10,0 g de biomasa húmeda -previamente lavada con abundante agua desionizada para eliminar posibles restos de residuos interferentes- y 0,5 L de solución (agua ultra pura para el grupo “Control” o solución de metales para el grupo “Muestra”). La biomasa contenida en las unidades experimentales se mantuvo en el vaso de precipitado durante 48 h, tomándose muestras de la columna de agua a las 0, 2, 4, 6, 10, 24 y 48 h, para evaluar la cantidad de metal remanente según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.

2.4 Cuantificación del metal adsorbido en la biomasa vegetal.

El contenido de metal en la biomasa se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Tello Zevallos y col. (2018) con leves modificaciones. Brevemente, a cada tiempo de exposición se retiró la biomasa y se realizó un lavado con 0,5 L de solución de EDTA (1,7 mM) durante 1 h con agitación orbital (180 rpm) con el objetivo de secuestrar por complejación el metal adsorbido superficialmente a las raíces de las plantas. Finalizada la agitación, se lavó la biomasa con abundante agua desionizada, se la dejó escurrir durante 5 min, y a continuación se la dejó reposar durante 15 min sobre papel absorbente con la finalidad de eliminar el exceso de humedad en la parte externa del tejido. El contenido de metal en el agua de lavado fue cuantificado por EAA (sección 2.2.2).

2.5 Cuantificación del metal acumulado intracelularmente.

La cantidad de metal acumulado intracelularmente se determinó sobre una porción de material vegetal (separadamente, raíces y hojas) previamente secada en estufa a 70°C durante 24 h. Para ello, a 50,0 mg de biomasa seca triturada se le adiciono 1,0 mL de HNO₃ cc. Posteriormente, la muestra se colocó en un bloque de digestión bajo una campana de extracción, y se calentó a 120°C durante 3 h hasta observar la desaparición de vapores pardos. El contenido del metal intracelular en cada una de las muestras digeridas fue analizado por EAA (sección 2.2.2).

2.6 Determinación de parámetros fisiológicos.

Para determinar la tolerancia de *Salvinia* sp. frente al tratamiento con los distintos metales se evaluaron diferentes parámetros fisiológicos en las hojas flotantes de las plantas, luego de 48 h de exposición a 50±2 o 100±1 µM de cada metal.

2.6.1. Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos.

La extracción de pigmentos fotosintéticos se llevó a cabo macerando 0,1 g de muestra con 1,0 mL de etanol 96% (v/v) durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente para permitir su completa extracción. A continuación, se centrifugó la solución a 2.500xg durante 10 min, y se determinó la concentración de clorofilas (*a*, *b* y total) midiendo la absorbancia del sobrenadante a 649 y 665 nm, y el contenido de carotenoides (carotenos y xantófilas) a 480 nm, empleando un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer® Lambda 25). El contenido de pigmentos fotosintéticos se calculó mediante las ecuaciones propuestas por Wintermans y De Mots (1965):

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g/mL}) = 12,19(A_{665}) - 3,45(A_{649})$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g/mL}) = 21,99(A_{649}) - 5,32(A_{665})$$

Donde,

12,63 y 3,45 = coeficientes de extinción (ϵ) de la clorofila *a* para 665 nm (ϵ_{665}) y 649 nm (ϵ_{649}).

21,99 y 5,32 = coeficientes de extinción (ϵ) de la clorofila *b* para 649 nm (ϵ_{649}) y 665 nm (ϵ_{665}).

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

$$\text{Carotenoides} (\mu\text{g/mL}) = [(1000A_{480} - 2,14[\text{Chl}_a]) - 70,16[\text{Chl}_b]]/220$$

2.6.2. Cuantificación de antocianinas.

Se empleó el procedimiento descrito por Bizzo y col (2014). Para ello, se adicionaron 5,0 mL de una solución de metanol y ácido clorhídrico 99:1 (v/v) sobre 50,0 mg de muestra, y se incubó en oscuridad por 24 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2.500xg durante 10 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 550 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer® Lambda 25). Para el cálculo de la concentración de antocianinas se utilizó un coeficiente de extinción molar (ϵ) igual a 33.000 mol⁻¹ cm⁻¹.

2.6.3. Determinación de flavonoides.

La extracción de flavonoides totales se realizó mediante el tratamiento de 50,0 mg de muestra con N₂ líquido, seguido de una primera extracción con 0,6 mL de metanol ácido (HCl 1% (v/v) en metanol), y posterior incubación durante 8 h en oscuridad, a temperatura ambiente. Luego, se realizó una segunda extracción con 1,2 ml de cloroformo y 0,6 mL de agua desionizada. La solución resultante se centrifugó a 4.500xg durante 2 min, descartándose la fase orgánica. Finalmente, se midió la absorbancia de la fase a 312 y 530 nm (Casati y Walbot, 2005), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer® Lambda 25).

2.6.4. Cuantificación de carbohidratos solubles.

Se utilizó el método propuesto por Bizzo y col (2014). Brevemente, se mezclaron 0,1 g de biomasa triturada con 2 mL de metanol (80%). Luego, las muestras se calentaron a 70°C durante 30 min. Una vez a temperatura ambiente, se tomó 1,0 mL del extracto y se mezcló con 1,0 mL de Fenol (5%) y 5 mL de ácido sulfúrico (95%). Posteriormente, la mezcla se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de la muestra a 640 nm empleando un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer® Lambda 25).

2.7. 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 %.

3. Resultados y Discusión

3.1 Evaluación de la capacidad de eliminación de metales pesados utilizando *Salvinia* sp.

La capacidad de *Salvinia* para eliminar Cd, Pb, Cu y Zn en muestras de agua contaminadas artificialmente con 50 ± 2 o $100 \pm 1 \mu\text{M}$ de cada metal, en forma independiente, se determinó cuantificando la concentración residual de cada ión en la columna de agua a distintos tiempos de exposición. Como puede observarse en la Tabla 1, el porcentaje de remoción alcanzó valores de $76 \pm 7\%$ y $90 \pm 2\%$ en las primeras 6 h para $50 \pm 2 \mu\text{M}$ de Cu y Pb, respectivamente. Durante el mismo período de tiempo (6 h), y a la misma concentración inicial (50 ± 2), los porcentajes de eliminación disminuyeron significativamente para Cd y para Zn, alcanzando valores cercanos al 60%. Al finalizar el ensayo (48 h), tanto el Cu como el Pb fueron completamente removidos de la columna de agua (remoción $\geq 99\%$). Sin embargo, en idénticas condiciones, el % de eliminación no superó el 80% para Cd y Zn. Al duplicar la concentración de exposición ($100 \pm 1 \mu\text{M}$), la eficiencia de remoción de las plantas fue similar para Cu y para Pb, mostrando mayores dificultades para la eliminación de Cd y Zn. A su vez, es notable observar la elevada eficiencia de estas macrófitas para remover casi el 100% del Cu y del Pb durante las primeras 24 h, aún a la concentración más alta analizada, demostrando una elevada capacidad de *Salvinia* sp. para bio-concentrar estos iones.

Adicionalmente, la cinética no lineal de desaparición observada en la Figura 1, para ambas concentraciones de los distintos metales analizados, sugiere que *Salvinia* sp. utiliza diferentes mecanismos para la remoción de metales divalentes en aguas contaminadas.

Cabe mencionar también que no se detectaron cantidades considerables de ninguno de los metales en la columna de agua para el grupo "Control", demostrando la ausencia de contaminación previa o externa.

Tabla 1. Porcentajes de remoción para Cd, Cu, Pb y Zn a distintos tiempos y concentración de exposición en sistemas en *batch* operados con *Salvinia* sp.

Tiempo de exposición (h)	$50 \pm 2 \mu\text{M}$				$100 \pm 1 \mu\text{M}$			
	[Cd]	[Cu]	[Pb]	[Zn]	[Cd]	[Cu]	[Pb]	[Zn]
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	27 ± 2	46 ± 9	50 ± 17	29 ± 1	19 ± 1	42 ± 29	66 ± 1	15 ± 1
4	52 ± 2	62 ± 6	82 ± 1	49 ± 1	25 ± 6	66 ± 10	81 ± 3	33 ± 4
6	56 ± 6	76 ± 7	90 ± 2	51 ± 1	30 ± 7	77 ± 11	86 ± 1	42 ± 7
10	69 ± 3	90 ± 8	94 ± 1	67 ± 7	37 ± 3	84 ± 9	97 ± 1	59 ± 1
24	72 ± 1	98 ± 2	96 ± 1	72 ± 3	50 ± 4	99 ± 1	99 ± 1	69 ± 3
48	79 ± 4	99 ± 1	97 ± 2	77 ± 5	56 ± 2	100 ± 1	99 ± 1	70 ± 4

Los valores informados en la tabla representan el promedio \pm SE ($n=2$).

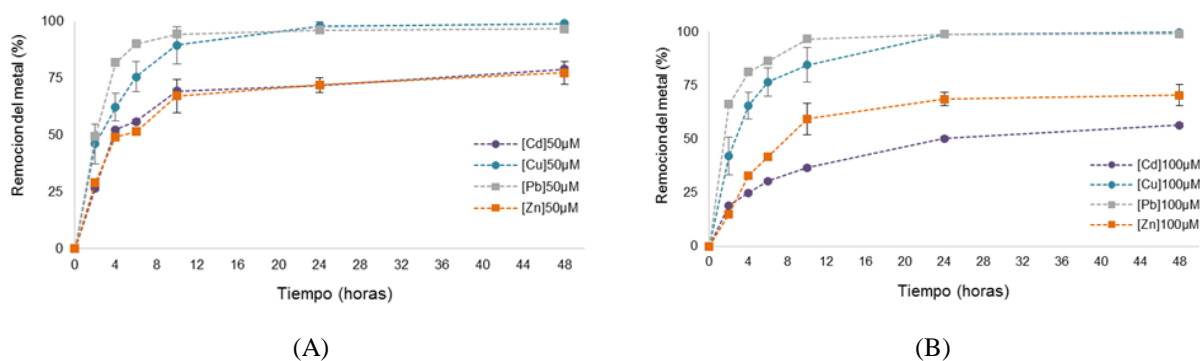


Figura 1. Cinéticas de eliminación de metales divalentes en la columna de agua, a distintos tiempos y concentración: (A) $50 \pm 2 \mu\text{M}$ y (B) $100 \pm 1 \mu\text{M}$. Los valores representan el promedio \pm SE ($n=2$).

3.2. Análisis de compartimentalización

Con el fin de avanzar en el entendimiento de los diferentes mecanismos involucrados en la eliminación de metales pesados por *Salvinia* sp., se evaluó la distribución del metal en la planta a través de un análisis de

compartimentalización (Olguín y col, 2005). Para ello, se definieron tres destinos o “compartimentos” donde encontrar al metal: 1) adsorbido superficialmente a la biomasa, 2) acumulado intracelularmente en la biomasa total (sin discernir entre raíces y hojas flotantes) y, 3) remanente en la columna de agua. En la Figura 2 se muestra la distribución de cada metal en los diferentes compartimentos de la planta luego de finalizado el proceso de remediación (48 h). Como puede observarse, la mayor cantidad de los cuatro metales analizados se encuentra acumulada intracelularmente, para ambas concentraciones. Sin embargo, los porcentajes de acumulación fueron muy diferentes según el metal y la concentración inicial (C_i) a la que fue expuesta la planta, mostrando mayores niveles de acumulación a medida que aumenta la C_i del metal en la solución.

El porcentaje de metal adsorbido superficialmente también mostró un incremento conforme el aumento en la C_i ; sin embargo, a las 48 h, los niveles de adsorción fueron menores en relación al porcentaje acumulado intracelularmente. Estos resultados indican que la cantidad de metal acumulado y adsorbido por *Salvinia* sp. parece estar afectada positivamente por la C_i del metal, incrementándose a medida que se eleva la concentración del contaminante en la solución.

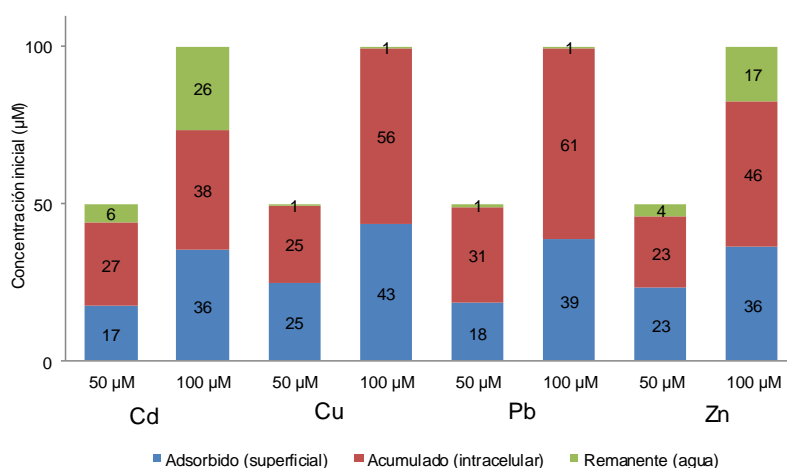


Figura 2. Distribución de Cd, Cu, Pb y Zn en los tres compartimentos definidos para *Salvinia* sp. luego de (48 h) de exposición a distintas C_i de cada metal, en forma independiente. Las barras representan el promedio \pm SE ($n=2$).

En general, los iones metálicos penetran en las plantas principalmente a través del sistema radicular en donde la mayor cantidad del metal se encuentra unido a la pared celular (Samardakiewicz y Wozny, 2000, Antosiewicz, 2005). En ésta, los polisacáridos celulosa, lignina y hemicelulosa juegan un rol esencial en la complejación de los metales (Seregin e Ivanov, 2001, Gardea y col., 2004, Marmioli y col., 2005, Polec y col., 2007). Adicionalmente, Olguín y col. (2005) han sugerido que la acumulación intracelular de algunos metales divalentes, como el Pb, en *Salvinia minima* podría ocurrir a través de calcio. Sin embargo, aún se necesitan más evidencias experimentales que sustenten esta hipótesis.

Por otro lado, la alta capacidad de *Salvinia* sp. para acumular metales podría atribuirse, además del contenido de carbohidratos de su raíz, a la síntesis de proteínas con grupos tiol. En un estudio llevado a cabo por Estrella-Gómez y col. (2009), estos autores reportaron que el Pb induce la producción de fitoquelatinas en *Salvinia minima* Baker y que tales proteínas podrían estar involucradas en procesos de desintoxicación como parte de un mecanismo de tolerancia al metal desarrollado por esta planta. Más aún, las fitoquelatinas serían responsables de captar y complejar al metal permitiendo su almacenamiento en vacuolas y compartimentos intracelulares.

Si bien, aún se necesitan más estudios que permitan dilucidar, a nivel molecular, la complejidad de los mecanismos involucrados en la captación de metales por plantas acuáticas del género *Salvinia*, nuestros resultados son consistentes con reportes previos que indican a la adsorción superficial y a la acumulación intracelular como dos de los mecanismos principales.

3.3. Fitotoxicidad de metales pesados en plantas del género *Salvinia* sp.

Los efectos fitotóxicos observados en la biomasa de *Salvinia* sp. luego de su exposición a diferentes concentraciones de Cd, Cu, Pb y Zn se muestran en la Figura 3. Como se puede apreciar, luego de 48 h de exposición a $100 \pm 1 \mu\text{M}$ de los diferentes metales, analizados en forma independiente, se pudo evidenciar mediante inspección visual de los especímenes algunos claros síntomas de fitotoxicidad, tales como la necrosis de sus hojas, la desintegración parcial de

las raíces sumergidas en la solución y la pérdida de turgencia.

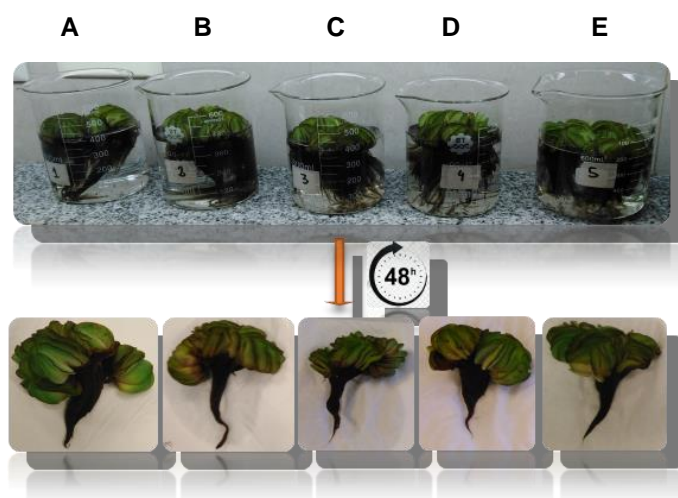


Figura 3. Fotografías ilustrativas de los cambios observados en la biomasa de *Salvinia* sp expuesta durante 48 h a: a) agua desionizada (grupo “Control”); B) Cd ($100 \pm 1 \mu\text{M}$); C) Cu ($100 \pm 1 \mu\text{M}$); D) Pb ($100 \pm 1 \mu\text{M}$); E) Zn ($100 \pm 1 \mu\text{M}$).

Si bien, en algunos casos, estas observaciones se correlacionaron parcialmente con alteraciones en la concentración de pigmentos fotosintéticos, compuestos antioxidantes y carbohidratos solubles en las hojas flotantes de las plantas, no se pudo evidenciar un patrón generalizado de fitotoxicidad para los cuatro metales analizados.

Como puede observarse en la Tabla 2, el contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides se vio diferencialmente afectado según el metal al que fueron expuestas las plantas. La clorofilas *a*, *b* y total resultaron ser los parámetros fisiológicos más afectados luego de la exposición durante 48 h a Cu y Pb, evidenciando una disminución significativa ($p < 0,075$) a la mayor concentración ensayada. Sin embargo, no se observaron variaciones significativas en los valores de carotenoides (Car) para todos los grupos, excepto a una concentración de $100 \pm 1 \mu\text{M}$ de Cu, donde el contenido de estos compuestos disminuyó respecto al grupo “Control”.

Por su parte, no se evidenciaron cambios en la concentración de compuestos fenólicos (flavonoides y antocianinas) frente a la exposición a metales pesados. Estos compuestos son metabolitos secundarios derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, y se encuentran distribuidos de forma ubicua en las plantas (Kähkönen y col, 1999, Kovasik y col, 2015). Estudios recientes han sugerido que pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos y también como moléculas antioxidantes para eliminar radicales libres, ayudando a la protección de las células frente al estrés oxidativo (Mierziak y col, 2014). Sin embargo, en este estudio, la concentración de flavonoides y antocianinas no mostró cambios significativos frente al ocasional estrés provocado por la exposición a metales, respecto del grupo control. Estos resultados podrían indicarnos que, en las condiciones experimentales ensayadas, no se estaría generando un estrés oxidativo suficientemente importante para disparar un incremento en la acumulación de los pigmentos antioxidantes, o bien, que la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (EROs) procedería por otra ruta metabólica. Más ensayos son necesarios para poder confirmar algunas de estas hipótesis.

Finalmente se analizaron los niveles de carbohidratos solubles observando un aumento significativo respecto del grupo control únicamente frente a la exposición a Pb ($50 \pm 2 \mu\text{M}$), no mostrando variaciones para ninguno de los otros tratamientos.

Tabla 2. Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides), antioxidantes y carbohidratos solubles en hojas de *Salvinia* sp. expuestas a 50 ± 2 o $100 \pm 1 \mu\text{M}$ de Cd, Pb, Cu o Zn.

Fronδας	Control	Cd _{50μM}	Cd _{100μM}	Cu _{50μM}	Cu _{100μM}	Pb _{50μM}	Pb _{100μM}	Zn _{50μM}	Zn _{100μM}
Chl "a" (μg/g PF)	156 ± 7 ^a	150 ± 16 ^a	160 ± 19 ^a	120 ± 23 ^b	102 ± 16 ^b	149 ± 26 ^a	127 ± 10 ^b	156 ± 11 ^a	169 ± 36 ^a
Chl "b" (μg/g PF)	105 ± 7 ^a	92 ± 8 ^a	99 ± 9 ^a	94 ± 19 ^a	65 ± 9 ^b	94 ± 14 ^a	81 ± 9 ^b	109 ± 14 ^a	105 ± 22 ^a
Chl Total (μg/g PF)	261 ± 14 ^a	242 ± 24 ^a	259 ± 28 ^a	243 ± 54 ^a	167 ± 25 ^b	243 ± 40 ^a	208 ± 18 ^a	265 ± 25 ^a	268 ± 60 ^a
Car (μg/g PF)	34 ± 2 ^a	43 ± 5 ^a	44 ± 5 ^a	45 ± 8 ^a	29 ± 4 ^b	44 ± 11 ^a	37 ± 2 ^a	34 ± 2 ^a	37 ± 6 ^a
Flavonoides (Abs/g PF)	87 ± 7 ^a	99 ± 4 ^a	82 ± 9 ^a	100 ± 10 ^a	64 ± 4 ^a	97 ± 11 ^a	76 ± 7 ^a	101 ± 19 ^a	73 ± 10 ^a
Antocianinas (Abs/g PF)	540 ± 57 ^a	684 ± 85 ^a	555 ± 120 ^a	570 ± 113 ^a	600 ± 40 ^a	703 ± 78 ^a	570 ± 50 ^a	610 ± 60 ^a	581 ± 50 ^a
Carbohidratos (mg/gPF)	38 ± 2 ^a	35 ± 3 ^a	43 ± 7 ^a	41 ± 8 ^a	38 ± 9 ^a	48 ± 2 ^b	37 ± 2 ^a	41 ± 7 ^a	23 ± 3 ^a

Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,075$) entre los valores promedios \pm SE ($n=2$).

En general, se ha descrito que 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 unión a proteínas y/o secuestrados en vacuolas intracelulares. Estos mecanismos restringen su translocación hacia los órganos superiores de la planta (hojas), fotosintéticamente más activos, protegiéndose así del daño provocado por la acumulación de metales pesados. La tolerancia de una planta a un metal específico es controlada por una red interrelacionada de mecanismos moleculares y fisiológicos diferentes que coadyuvan para contrarrestar la fitotoxicidad que produce (Shahid y col, 2018). Sin embargo, una vez que el metal se ha incorporado a nivel intracelular es igualmente capaz de alterar considerablemente los parámetros fisiológicos afectando directamente al metabolismo vegetal (Gardner y Hamdani, 1997, Nichols y col, 2000, Al Hamdani y Blair, 2004).

Estudios previos realizados por diferentes autores han validado la capacidad de diferentes especies del género *Salvinia* sp. para ser utilizadas en el tratamiento de aguas contaminadas con diversos compuestos, incluidos los metales pesados (Aksorn y Visoottiviseth, 2004, Maine y col, 2004, Dhir y col, 2009, Espinoza-Quiñones y col, 2009, González y col, 2014; Prado y col, 2016; Leal-Alvarado, 2016; Tello Zevallos y col, 2018, Castillo Loría y col, 2019; Olivera y col, 2019). Nuestros estudios concuerdan con estos antecedentes, demostrando que especies autóctonas de *Salvinia* sp, obtenidas de ecosistemas locales, también poseen esta capacidad, pudiendo ser introducidas como una herramienta biotecnológica de bajo costo al diseño de sistemas de saneamiento de aguas contaminadas con metales pesados.

4. Conclusiones

Se demostró la capacidad de especímenes autóctonos del género *Salvinia* para bioconcentrar y eliminar Cd, Cu, Pb y Zn. Adicionalmente, las plantas mostraron diferentes afinidades y mecanismos de captación y desintoxicación para cada metal, siendo mayor la eficiencia de remediación para Cu y Pb, respecto de Cd y Zn. Los parámetros fisiológicos de las hojas flotantes de *Salvinia* sp. se vieron relativa y diferencialmente afectados, hecho que sugiere una participación más activa de las raíces de las plantas en el proceso de eliminación de los metales analizados. Tanto el porcentaje de remoción de los cationes divalentes como su grado de toxicidad fueron dependientes de la concentración inicial y del tiempo de exposición. En resumen, nuestros resultados sugieren que la utilización de estas macrófitas para la remediación de sistemas acuáticos contaminados con diferentes iones metálicos es prometedora. Por lo tanto, la incorporación de especímenes locales de *Salvinia* sp. en el diseño de sistemas de tratamiento de efluentes industriales podría ser una estrategia exitosa, y de muy bajo costo, para favorecer la remoción de metales pesados.

Agradecimientos

Los autores agradecen muy especialmente al *Vicerrectorado de Investigación e Innovación Académica* de la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA) por los fondos suministrados para la ejecución de este proyecto. La Ing. Amb. Wendi G. Llatance Oyarce agradece al *Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo* (PRONABEC) del Ministerio de Educación de la República del Perú por el apoyo económico recibido para la realización de sus estudios de posgrado.

Referencias bibliográficas

- Alonso, X., Hadad, H.R., Córdoba, C., Polla, W., Reyes, M.S., Fernández, V., y otros. (2018). Macrophytes as potential biomonitors in peri-urban wetlands of the Middle Parana River (Argentina). *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 312-323.
- Aksorn, E., Visoottiviseth, P. (2004). Selection of suitable emergent plants for removal of arsenic from arsenic contaminated water. *ScienceAsia*, 30, 105-113.
- Al-Hamdani, S., y Blair, S.L. (2004). Influence of copper on selected physiological response in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. *American Fern Journal*, 94, 47-56.
- Alloway, B.J. (2013). Heavy metals in soils, trace metals and metaloids in soils and their bioavailability (3ra ed.). Reading, UK: Springer.
- Antosiewicz, D.M. (2005). Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environmental Pollution*, 134, 23-34.
- Azimi, A., Azari, A., Rezakazemi, M., Ansarpour, M. (2017). Removal of heavy metals from industrial wastewaters: a review. *ChemBioEng. Reviews*, 4, 37-59.

- Azubuiké, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C. (2016). Bioremediation techniques classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 180-198.
- Barakat, M.A. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 361-377.
- 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, 268-277.
- Casati P, Walbot V, (2005), *Plant Cell & Environment*, 28, 788-799.
- Castillo Loría K., Emiliani J., Herrero M.S., Bergara C.D., Salvatierra L.M., Pérez L.M. (2019). Effect of daily exposure to Pb-contaminated water on *Salvinia biloba* physiology and phytoremediation performance *Aquatic Toxicology*, 210, 158-166.
- Dhir, B. (2009). *Salvinia*: An aquatic fern with potential use in phytoremediation. *Environment & We: An International Journal of Science and Technology*, 4, 23-27.
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U.B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B.P., Rai, J.P., Sharma, P.K., Lade, H., Paul, D. (2015). Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, 7, 2189-2212.
- Efroymson, R.A., Will, M.E., Suter, G.W., Wooten, A.C. (1997). Toxicological Benchmarks for Screening Contaminants of Potential Concern for Effects on Terrestrial Plants, Oak Ridge National Laboratory, Environmental Sciences Division.
- Espinoza-Quiñones, F.R., Da Silva, E.A., de Almeida Rizzutto, M., Palácio, S.M., Módenes, A.N., Szymanski, N., Alexander, N.M., Kroumov, A.D. (2008). Chromium ions phytoaccumulation by three floating aquatic macrophytes from a nutrient medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 3063-3070.
- Estrella-Gómez, N., Mendoza, D., Moreno, R., González, D., Zapata, O., Martínez, A., Santamaría, J.M. (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology*, 91, 320-328.
- Gardea, J.L., De la Rosa, G., Peralta, J.R. (2004). Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review. *Pure and Applied Chemistry*, 76, 801-813.
- Gardner, J.L. y Al-Hamdani, S.H. (1997). Interactive Effects of Aluminium and Humic Substances on *Salvinia*. *Journal of Aquatic Plant Management*, 35, 30-34.
- González, C.I., Maine, M.A., Cazenave, J., Sanchez, G.C., Benavides, M.P. (2014). Physiological and biochemical responses of *Eichhornia crassipes* exposed to Cr (III). *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 3739–3747.
- Haslett, B.S., Reid, R.J., Rengel, Z. (2001). Zinc mobility in wheat: uptake and distribution of zinc applied to leaves or roots. *Annals of Botany*, 87, 379-386.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-62.
- Kumari, S., Kumar, B., Sheel, R. (2016). Bioremediation of heavy metals by serious aquatic weed, *Salvinia*. *International Journal of Current microbiology and applied sciences*, 5, 355-368.
- Leal-Alvarado, D., 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.
- Li, N., Kang, Y., Pan, W., Zeng, L., Zhang, Q., Luo, J. (2015). Concentration and transportation of heavy metals in vegetables and risk assessment of human exposure to bioaccessible heavy metals in soil near a waste-incinerator site, South China. *Science of the Total Environment*, 15, 521-522, 144-151.
- Maine, M.A., Suñé, N.L., Lagger, S.C. (2004). Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Waters Research* 38, 1494-1501.
- Marschner, H. (1998). Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press*, 313-396.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., Marmioli, N. (2005). Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: An X-ray spectroscopy-based analysis. *Environmental Pollution*, 134, 217-227.

- Mierziak, J., Kamil K., Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19, 16240-16265.
- Mishra, B., Sangwan, R.S., Mishra, S., Jadaun, J.S., Sabir, F., Sangwan, N.S. (2014). Effect of cadmium stress on inductive enzymatic and nonenzymatic responses of ROS and sugar metabolism in multiple shoot cultures of Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal). *Protoplasma*. 251, 1031-1045.
- Molinari, M., Tucac, G., Bentivegna, D. (2015). Efecto y concentración del cobre en cultivos regados con sulfato. XXII Congreso Latinoamericano de Malezas (ALAM) y I Congreso Argentino de Malezas (ASACIM).
- Nichols, P.B., Couch, J.D., Al-Hamdani, S.H. (2000). Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentration. *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, 577-586.
- Oliveira, J.C.G., de Moraes Ferreira, R. Stapelfeldt, D.M.A. (2019). Use of *Salvinia sp* on the adsorption of hexavalent chromium. *Environmental Science and Pollution Research*. 26, 30463-30471.
- Podazza, G., Rosa, M., Gonzalez, A.J., Hilal, M., Prado, F.E. (2006). Cadmium induces changes in sucrose partitioning, invertase activities, and membrane functionality in roots of Rangpur Lime (*Citrus limonia* L. Osbeck). *Plant Biology*, 8, 706-714.
- Polec, K., Ruzik, R., Lipiec, E., Ciurzyńska, M., Gawrońska, H. (2007). Investigation of Pb (II) binding to pectin in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 968-972.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 213, 113-136.
- 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.
- Podazza, G., Rosa, M., Gonzalez, A.J., Hilal, M., Prado, F.E. (2006). Cadmium induces changes in sucrose partitioning, invertase activities, and membrane functionality in roots of Rangpur Lime (*Citrus limonia* L. Osbeck). *Plant Biology*, 8, 706-714.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F., (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180, 169-181.
- Samardakiewicz, S., y Woźny, A. (2000). The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. *Plant and Soil*, 226, 107-111.
- Seregin, I.V., e Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48, 523-544.
- Shahid, M.A., Balal, R.M., Khan, N., Zotarelli, L., Liu, G., Ghazanfar, M.U., Garcia-Sanchez, F. (2018). Ploidy level of citrus rootstocks affects the carbon and nitrogen metabolism in the leaves of Chromium-stressed Kinnow mandarin plants. *Environmental and Experimental Botany*, 149, 70-80.
- Tello Zevallos, W., Salvatierra, L.M., Loureiro, D.B., Morató, J., Pérez, L.M., (2018). Evaluation of the autochthonous free-floating macrophyte *Salvinia biloba* Raddi for use in the phytoremediation of water contaminated. *Desalination Water Treatment*, 103, 282–289.
- Wang, F., Wang, M., Liu, Z., Shi, Y., Han, T., Ye, Y., Gong, N., Sun, J., Zhu, C. (2015). Different responses of low grain -Cd-accumulating and high grain-Cd-accumulating rice cultivars to Cd stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 261-269.
- Wintermans J.F., De Mots A., (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophyll *a* and *b* and their phaeophytins in ethanol, *Biochimica et Biophysica Acta*, 109, 448-455.
- Wolf, G.I., Pereira, G.C., Castro, E.M., Louzada, J., Coelho, F.F. (2012). The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. *Brazilian Journal of Biology*, 72, 71-77.