

Castillo Loria, Kristel ; Herrero, Sol M. ; Bergara, C. Daniela ; Salvatierra, Lucas M. ; Pérez, Leonardo M.

*Fitorremediación de aguas contaminadas con Pb^{2+} utilizando macrófitas del género *Salvinia*: evaluación de la intensidad y periodicidad de la descarga contaminante sobre la eficiencia del proceso y la fisiología vegetal*

Energeia, Vol. 15, N° 15, 2018

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:

Castillo Loria, K. et al. Fitorremediación de aguas contaminadas con Pb^{2+} utilizando macrófitas del género *Salvinia* : evaluación de la intensidad y periodicidad de la descarga contaminante sobre la eficiencia del proceso y la fisiología vegetal [en línea]. *Energeia*, 15(15), 2018. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/greenstone/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=Revistas&d=fitoremediacion-aguas-contaminadas-pb2> [Fecha de consulta:]

Fitorremediación de aguas contaminadas con Pb^{2+} utilizando macrófitas del género *Salvinia*: evaluación de la intensidad y periodicidad de la descarga contaminante sobre la eficiencia del proceso y la fisiología vegetal

Kristel Castillo Loría^{1,2}, M. Sol Herrero¹, C. Daniela Bergara¹, Lucas M. Salvatierra^{1,3},
Leonardo M. Pérez¹

¹ Departamento de Investigación Institucional, Facultad de Química e Ingeniería del Rosario, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA-Rosario). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rosario (Santa Fe), Argentina.

² Sede del Atlántico, Universidad de Costa Rica, Turrialba (Cartago), Costa Rica.

³ Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CONICET, La Plata, Argentina.

Resumen. La fitorremediación empleando plantas acuáticas ha demostrado ser una estrategia muy útil para sanear aguas contaminadas con metales pesados. *Salvinia biloba* Raddi es una macrófita autóctona de flotación libre, abundante en nuestra región, con probada capacidad para hiperacumular Pb^{2+} . En el presente trabajo, se analizó la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* ante la descarga diaria de agua contaminada con Pb^{2+} , y los efectos que esta exposición continua y prolongada causa sobre los parámetros fisiológicos de la planta. Para ello, se evaluó la eficiencia de remoción de Pb^{2+} en individuos de *S. biloba* expuestos diariamente a una descarga de agua contaminada artificialmente con diferentes concentraciones de Pb^{2+} ($1,88\pm 0,15$; $2,65\pm 0,07$; $12,62\pm 0,02$ y $30,57\pm 0,01$ mg/L), durante 10 días consecutivos. Se demostró la capacidad de *S. biloba* para mantener una elevada eficiencia de remoción de Pb^{2+} bajo estas condiciones de estrés agudo, siendo esta eficiencia dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al metal. Los parámetros fisiológicos de las plantas (índice de estabilidad de membrana, contenido de carbohidratos solubles, concentración de pigmentos fotosintéticos y antioxidantes) se vieron notablemente afectados, tanto a nivel de las raíces (lacinias) como de las hojas (frondas). En general, el grado de deterioro de las raíces fue superior, hecho que sugiere una mayor implicancia de estos órganos en el proceso de remoción de Pb^{2+} por *S. biloba*.

Palabras clave: saneamiento ambiental, fitorremediación, metales pesados, plomo, macrófitas autóctonas, *Salvinia biloba* Raddi.

Abstract. Phytoremediation using aquatic plants has proved to be a very successful strategy for cleaning up waters contaminated with heavy metals. *Salvinia biloba* Raddi is a highly abundant autochthonous free-floating macrophyte from our region that hyperaccumulate Pb^{2+} . In this work, *S. biloba* phytoremediation capacity was analyzed under stress conditions induced by the daily discharge of water contaminated with Pb^{2+} . Additionally, changes at leaves and roots physiological parameters were also assessed. For these purposes, Pb^{2+} removal was evaluated in *S. biloba* specimens exposed to a daily discharge of water contaminated with 1.88 ± 0.15 , 2.65 ± 0.07 , 12.62 ± 0.02 and 30.57 ± 0.01 mg Pb^{2+} /L, during 10 consecutive days. *S. biloba* demonstrated a great ability to maintain a high efficiency for Pb^{2+} removal under these stressing conditions, and that efficiency showed to be dependent on metal concentration and exposure time. Plants physiological parameters (membrane stability index, soluble carbohydrates content and photosynthetic and antioxidants pigments concentration) were significantly affected both at roots (lacinias) and leaves (fronds). In general, roots deterioration was higher suggesting a greater implication of these organs in Pb^{2+} removal by *S. biloba*.

Keywords: environmental sanitation, phytoremediation, heavy metals, lead, autochthonous free-floating macrophytes, *Salvinia biloba* Raddi.

1. Introducción

El tratamiento de las aguas residuales es un reto para las sociedades comprometidas con el

desarrollo sostenible visto que la producción de efluentes contaminantes es una consecuencia inevitable de las actividades humanas. Entre los contaminantes ambientales más ampliamente estudiados debido a su elevada toxicidad y ecotoxicidad se encuentran los metales y los metaloides (Dixit y col., 2015). Estos compuestos se caracterizan por su capacidad para acumularse en los organismos vivos que forman las cadenas tróficas. Si bien, la presencia de estas sustancias en los ecosistemas tiene tanto origen natural como antropogénico, la contaminación de las aguas se encuentra directamente asociada con las actividades industriales, ya que éstas introducen grandes cantidades de metales tóxicos en los sistemas acuáticos (McGrath y Zhao, 2003).

El plomo (Pb^{2+}) es uno de los metales pesados más abundantes y más ampliamente distribuidos en el ambiente. Las principales fuentes de dispersión de este metal han sido las fundiciones y la actividad minera, así como su antigua presencia como aditivo en pinturas, combustibles, baterías ácidas, plaguicidas y fertilizantes. Si bien este metal se ha reemplazado en muchas de sus aplicaciones, los problemas actuales derivados de su toxicidad se hallan vinculados con su persistencia en el polvo urbano de las ciudades y como consecuencia del impacto de las precipitaciones y de la escorrentía agrícola sobre la cadena trófica, ya sea a través del consumo de cultivos contaminados o a nivel de su presencia en los cursos de ríos y aguas subterráneas (Wani y col., 2015).

Numerosos estudios han demostrado que el género *Salvinia* posee una excelente capacidad para ser empleado en el saneamiento de aguas contaminadas con metales tóxicos (Dhir, 2009; Kumari y col., 2016), no obstante pocos trabajos se han desarrollado en Argentina con las especies autóctonas que crecen en los ecosistemas locales (Paris y col. 2005; Suñe y col., 2007; Prado y col., 2016). Recientemente, Tello Zevallos y col. (2015) evaluaron la capacidad de *S. biloba* Raddi, una macrófita muy abundante en los humedales de las costas santafesinas, para eliminar Pb^{2+} en muestras acuosas contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de este metal ($4,8\pm 0,3$; $9,1\pm 0,4$ y $19,6\pm 0,5$ mg/L) y a distintos tiempos de exposición (0; 0,5; 2; 4; 6; 12 y 24 h). Estos autores concluyeron que, al igual que otras especies de este género, *S. biloba* posee una gran capacidad para remediar Pb^{2+} alcanzando eficiencias de remoción superiores al 90% en tan sólo 24 h (Olguín y col., 2002; Olguín y col., 2005; Sánchez Galván y col., 2008). Además, Tello Zevallos y col. (2015) demostraron que *S. biloba* posee la capacidad de hiperacumular Pb^{2+} , y establecieron que la adsorción superficial es el mecanismo principal involucrado en la eliminación del metal. Sin embargo, no existen estudios que evalúen cómo se ve afectada la capacidad de remoción de Pb^{2+} en *Salvinia* sp. frente a una exposición prolongada y repetida al metal. Asimismo, no hay antecedentes sobre las repercusiones que dicho estrés toxicológico podría producir sobre los parámetros fisiológicos de la planta.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue simular una situación de cuerpos de agua receptores expuestos a la descarga diaria de Pb^{2+} , 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.

2. Materiales y Métodos

2.1. Obtención del material vegetal.

Los especímenes de *S. biloba* se colectaron 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 $32^{\circ}52'35''$ Sur y longitud $60^{\circ}40'33''$ Oeste, Argentina). Posteriormente, se trasladaron a la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA- Rosario) para ser conservados a temperatura ambiente en peceras de vidrio con una combinación de agua potable municipal y agua de la laguna.

2.2. Determinación de la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* ante la descarga diaria de Pb^{2+} .

La capacidad de *S. biloba* para remover el metal se evaluó en muestras de agua contaminadas artificialmente con $1,88\pm 0,15$; $2,65\pm 0,07$; $12,62\pm 0,02$ y $30,57\pm 0,01$ mg Pb^{2+} /L. Cada concentración fue considerada como un tratamiento. El periodo de evaluación para todos los grupos experimentales fue de 10 días. Para cada ensayo se utilizaron cuatro unidades experimentales (Fig. 1) compuestas por un grupo "Control" y tres réplicas por tratamiento ($n=3$). Cada unidad experimental consistió de 10,0 g de biomasa húmeda previamente lavada por 10 min con abundante agua para eliminar posibles restos de residuos interferentes y 400 mL de solución (agua ultra pura para el grupo "Control" o solución de Pb^{2+} para los distintos tratamientos). La biomasa contenida en las unidades experimentales se trasvasó a un vaso de precipitado con 400 mL de solución fresca cada 24 h. Junto con este procedimiento, se tomó una muestra de la columna de agua para evaluar la cantidad de Pb^{2+} remanente según el procedimiento descrito en el apartado 2.3.



Figura 1. Fotografía ilustrativa del sistema experimental utilizado en el presente estudio.

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

La determinación de Pb^{2+} residual en la columna de agua se realizó por espectroscopia de absorción atómica empleando un equipo Varian® AA240FS, según el procedimiento descrito por Tello Zevallos y col. (2015). Previamente a las determinaciones, se realizó una curva de calibración con soluciones patrones de Pb^{2+} de concentración conocida (5-30 ppm) preparadas en agua acidulada (HNO_3 cc. 0,15%).

2.4. Determinación de los 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 aguda al Pb^{2+} se llevó a cabo, al final de los 10 días de ensayo, una evaluación del contenido de clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides, carbohidratos solubles e índice de estabilidad de membrana. Para ello, se lavó abundantemente 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 evaluando por separado tanto frondas (hojas) como lacinias (raíces).

2.4.1. Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos.

La cuantificación de clorofilas (*a*, *b* y total) y carotenoides se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Leal y col. (2016). Para ello, se adicionaron 4,5 mL de acetona (80%) a 50 mg de biomasa triturada y se incubó en oscuridad por 24 h. Luego de centrifugar las muestras (10 min, 3000 r.p.m.) se midió la absorbancia del sobrenadante a 470, 646 y 663 nm con un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer® Lambda 25).

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

$$Chl_a (\mu g/mL) = 12,21(A_{663}) - 2,81(A_{646})$$

$$Chl_b (\mu g/mL) = 20,13(A_{646}) - 5,03(A_{663})$$

$$Chl_{total} (\mu g/mL) = Chl_a + Chl_b$$

$$Carotenoides (\mu g/mL) = [(1000A_{470} - 3,27[Chl_a]) - 104[Chl_b]]/198$$

2.4.2. Cuantificación de antocianinas.

Se empleó el procedimiento descrito por Bizzo y col. (2014). Para ello, 5 mL de una solución de metanol y ácido clorhídrico 99:1 (v/v) se adicionó sobre 50 mg de biomasa, y se incubó en oscuridad por 24 h. Posteriormente, las muestras se (10 min, 3000 r.p.m.) 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 absorptividad molar igual a $33.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.3. Determinación de flavonoides.

Se llevó a cabo según el procedimiento propuesto por Bizzo y col. (2014). Se mezclaron 50 mg de biomasa triturada con 5 mL de una solución de etanol y ácido acético 99:1 (v/v). Posteriormente, las muestras se hirvieron durante 10 min a baño maría ($80^\circ C$). Una vez alcanzada la temperatura ambiente se midió la absorbancia a 270, 300 y 330 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer® Lambda 25).

2.4.4. Cuantificación de carbohidratos solubles.

Se utilizó el método propuesto por Bizzo y col. (2014). Brevemente, se mezclaron 100 mg 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, 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 (Perkin Elmer® Lambda 25).

2.4.5. Índice de estabilidad de membrana.

El índice de estabilidad de membrana (MSI) se determinó a partir de mediciones de conductividad eléctrica de acuerdo al protocolo descrito por Prado y col. (2016). Para ello, se colocaron 50 mg de biomasa en tubos de ensayo con 10 mL de agua destilada y se incubaron a 40°C por 30 min. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se midió la conductividad eléctrica (E1) de las muestras utilizando un conductímetro Hanna® EC215. Inmediatamente obtenido este valor, los tubos se llevaron a baño maría (90°C) durante 15 min. Al enfriarse a temperatura ambiente, se midió nuevamente la conductividad eléctrica (E2) y se calculó el MSI (%) aplicando la siguiente ecuación:

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

2.5. 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. Capacidad fitorremediadora de *S. biloba* frente a descargas diarias de Pb^{2+} .

Como se observa en la Tabla 1, *S. biloba* mostró una excelente capacidad para remover el metal en las primeras 24 h, aún frente a la exposición con elevadas concentraciones de Pb^{2+} . Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por otros autores, demostrado la gran capacidad del género *Salvinia* para eliminar Pb^{2+} en muestras de agua contaminadas artificialmente (Banerjee y Sarker, 1997; Olgúin y col., 2002; 2005; Paris y col., 2005; Sánchez-Galván y col., 2008; Tello Zevallos y col., 2015).

Tabla 1. Porcentaje de remoción de Pb^{2+} en la columna de agua por *S. biloba* luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones del metal.

[Pb^{2+}] (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 %.

Notablemente, al evaluar la eficiencia de remoción de Pb^{2+} durante la exposición diaria a una concentración de 1,88±0,15 mg/L se observó que *S. biloba* mantuvo su capacidad al 100% durante los 10 días de ensayo (Fig. 2). Para el resto de las concentraciones ensayadas, las plantas mostraron un decaimiento en el porcentaje de eliminación del metal de la columna de agua, siendo más evidente esta caída conforme el aumento en la concentración de Pb^{2+} y el tiempo de exposición.

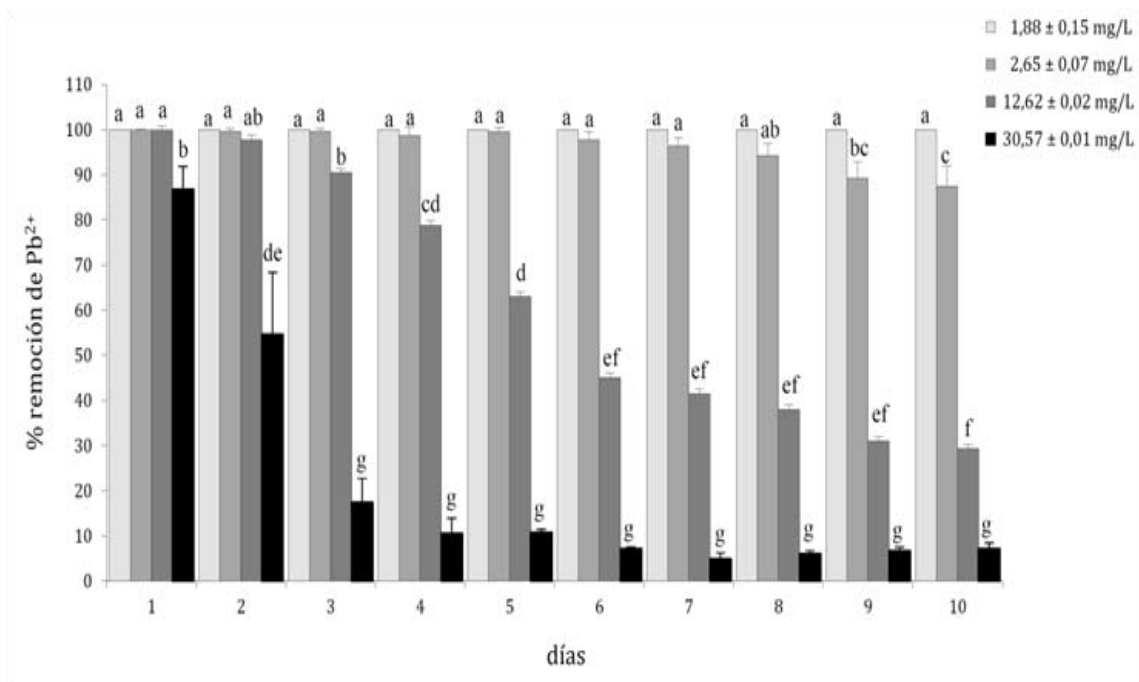


Figura 2. Remoción de Pb^{2+} en *S. biloba* expuesta a la descarga diaria de agua artificialmente contaminada con diferentes concentraciones de Pb^{2+} . Las barras representan el promedio \pm desvío estándar ($n=3$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Como se observa en la Fig. 2, frente a la descarga con agua contaminada con $2,65 \pm 0,07$ $mgPb^{2+}/L$ el porcentaje de remoción se mantuvo prácticamente invariable por 8 días en valores similares al alcanzado en las primeras 24 h (aprox. $93,9 \pm 2,9\%$). Sin embargo, al noveno día de descarga, este valor decayó significativamente ($p < 0,05$) respecto al alcanzado en los primeros 7 días. Hacia el final del periodo de estudio (10 días) el porcentaje de remoción de Pb^{2+} disminuyó hasta $86,8 \pm 4,8\%$. Si bien esta caída fue estadísticamente significativa, la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* aún se mantuvo muy elevada.

En contraste, al enfrentar a las plantas diariamente 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 por debajo del 80% a partir del cuarto día. Al final del ensayo (10 días), el porcentaje de remoción decayó hasta un valor de $29,5 \pm 8,0\%$ (Fig. 2). Este fenómeno fue más evidente a la máxima concentración de Pb^{2+} evaluada ($30,57 \pm 0,01$ mg/L). En este caso, la eficiencia de remoción obtenida en las primeras 24 h ($86,72 \pm 5,05\%$) fue significativamente menor a la alcanzada para las concentraciones más bajas. Además, este valor decayó muy marcadamente en tan sólo tres días, para mantenerse por debajo de un 7% hasta el final del estudio. Estos resultados demuestran la gran capacidad de *S. biloba* para remover el contaminante durante un periodo de tiempo significativo (10 días) mientras que la descarga sea suministrada diariamente en baja concentración. Adicionalmente, y como era de esperarse, no se detectó presencia de Pb^{2+} en la columna de agua para el grupo "Control" durante todo el ensayo, demostrando la ausencia de contaminación previa o externa.

3.2. Fitotoxicidad del Pb^{2+} sobre *S. biloba* expuesta a la descarga diaria de agua artificialmente contaminada.

Numerosas investigaciones han demostrado que la presencia de metales pesados en el medio de desarrollo altera considerablemente los parámetros fisiológicos de las macrófitas (Gardner y Hamdani, 1997; Nichols y col., 2000; Al Hamdani y Blair, 2004). Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados obtenidos luego de la cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila total y carotenoides), pigmentos antioxidantes (antocianinas y flavonoides) y carbohidratos solubles en especímenes de *S. biloba* expuestos durante 10 días a la descarga diaria de agua contaminada con diferentes concentraciones de Pb^{2+} , tanto en frondas como en lacinias.

Tabla 2. Parámetros fisiológicos en hojas (frondas) de *S. biloba* luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de Pb^{2+} . Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Variables fisiológicas	[Pb^{2+}] mg/L				
	control	1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01
<i>Chl_a</i> (µg/g FW)	317 ± 24 ^a	300 ± 24 ^a	247 ± 8 ^b	222 ± 21 ^{bc}	198 ± 15 ^c
<i>Chl_{total}</i> (µg/g FW)	426 ± 31 ^a	405 ± 32 ^a	330 ± 10 ^b	302 ± 27 ^b	311 ± 28 ^b
Carotenoides (µg/g FW)	78 ± 5 ^a	75 ± 6 ^a	72 ± 6 ^{ab}	64 ± 4 ^b	31 ± 2 ^c
Antocianinas (nmol/g FW)	246 ± 37 ^a	240 ± 36 ^a	212 ± 45 ^a	185 ± 23 ^a	209 ± 17 ^a
Flavonoides (UA/g FW)	32 ± 5 ^a	33 ± 2 ^a	32 ± 5 ^a	32 ± 3 ^a	12 ± 3 ^b
Carbohidratos solubles	160 ± 30 ^a	155 ± 14 ^a	146 ± 30 ^a	126 ± 22 ^a	46 ± 6 ^b
MSI (%)	70 ± 5 ^a	74 ± 2 ^a	73 ± 2 ^a	67 ± 11 ^a	17 ± 10 ^b

Como puede observarse, los pigmentos fotosintéticos fueron los compuestos más sensibles a la exposición aguda al Pb^{2+} . En las frondas, la cantidad de clorofilas (a y total) y carotenoides disminuyó significativamente ($p < 0,05$) respecto del grupo "Control" luego de la exposición diaria a 2,65±0,07; 12,62±0,02; y 30,57±0,01 mg Pb^{2+} /L por 10 días. Además, este efecto fue más notorio a medida que la concentración de exposición fue mayor. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los valores hallados para las plantas control y aquellas expuestas a 1,88±0,07 mg Pb^{2+} /L (Tabla 2).

Tabla 3. Parámetros fisiológicos en raíces (lacinias) de *S. biloba* luego de 10 días de descargas diarias a aguas contaminadas con diferentes concentraciones de Pb^{2+} . Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Variables fisiológicas	[Pb^{2+}] mg/L				
	control	1,88±0,15	2,65±0,07	12,62±0,02	30,57±0,01
<i>Chl_a</i> (µg/g FW)	317 ± 24 ^a	300 ± 24 ^a	247 ± 8 ^b	222 ± 21 ^{bc}	198 ± 15 ^c
<i>Chl_{total}</i> (µg/g FW)	426 ± 31 ^a	405 ± 32 ^a	330 ± 10 ^b	302 ± 27 ^b	311 ± 28 ^b
Carotenoides (µg/g FW)	78 ± 5 ^a	75 ± 6 ^a	72 ± 6 ^{ab}	64 ± 4 ^b	31 ± 2 ^c
Antocianinas (nmol/g FW)	246 ± 37 ^a	240 ± 36 ^a	212 ± 45 ^a	185 ± 23 ^a	209 ± 17 ^a
Flavonoides (UA/g FW)	32 ± 5 ^a	33 ± 2 ^a	32 ± 5 ^a	32 ± 3 ^a	12 ± 3 ^b
Carbohidratos solubles	160 ± 30 ^a	155 ± 14 ^a	146 ± 30 ^a	126 ± 22 ^a	46 ± 6 ^b
MSI (%)	70 ± 5 ^a	74 ± 2 ^a	73 ± 2 ^a	67 ± 11 ^a	17 ± 10 ^b

Como era de esperarse, las lacinias de *S. biloba* presentaron una cantidad inferior de pigmentos fotosintéticos en comparación con las frondas y, a diferencia de estas, sus valores sólo fueron afectados significativamente frente a la exposición a 30,57±0,01 mg Pb^{2+} /L (Tabla 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 iónicos con grupos funcionales cargados negativamente (por ej., carboxilos), mientras que en las frondas el Pb^{2+} es incorporado a nivel intracelular, afectando directamente al metabolismo vegetal. En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición al 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 la luz solar implicada en los procesos fotosintéticos (Leal y col, 2016).

Por su parte, la concentración de antocianinas en frondas de *S. biloba* no mostró diferencias

significativas (Tabla 2) en todos los grupos ensayados. Asimismo, la concentración de flavonoides se mantuvo invariable respecto al valor hallado para el grupo "Control" ante la exposición diaria a $1,88\pm 0,15$; $2,65\pm 0,07$ y $12,62\pm 0,02$ mgPb²⁺/L. Sin embargo, estos valores disminuyeron significativamente ante la descarga diaria de agua contaminada con $30,57\pm 0,01$ mgPb²⁺/L (Tabla 2). En las raíces, el efecto fitotóxico del Pb²⁺ fue mayor que en las hojas (Tabla 3). En este caso, la concentración de pigmentos antioxidantes se mantuvo invariable respecto del grupo "Control" sólo para la concentración más baja ensayada ($1,88\pm 0,15$ mgPb²⁺/L), mientras que a concentraciones mayores la cantidad de antocianinas y flavonoides disminuyó significativamente ($p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con la existencia de ciertos mecanismos que permiten mantener los niveles de compuestos antioxidantes en hojas de *Salvinia* frente a la exposición a metales pesados (Bizzo y col., 2014; Prado y col., 2016).

Por otro lado, la acumulación de carbohidratos solubles en *S. biloba* mostró diferentes tendencias según el órgano evaluado. En frondas, se observó una disminución en la cantidad de carbohidratos respecto al valor control conforme el aumento en la concentración del metal; si bien esta disminución sólo fue estadísticamente significativa para $30,57\pm 0,01$ mgPb²⁺/L (Tabla 2). 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 al valor hallado para el grupo "Control" ($p < 0,05$) a concentraciones de Pb²⁺ de $2,65\pm 0,07$; $12,62\pm 0,02$ y $30,57\pm 0,01$ mg/L (Tabla 3). Fenómenos similares han sido reportados por otros autores en raíces de macrófitas filogenéticamente relacionadas con el género *Salvinia* frente a la exposición a diferentes metales pesados (Wilson y Al-hamdani, 1997; Rosa y col., 2009).

Finalmente, el MSI (%) estimado para las frondas de los especímenes expuestos a $1,88\pm 0,15$; $2,65\pm 0,07$ y $12,62\pm 0,02$ mgPb²⁺/L no se vio afectado respecto al valor hallado para el grupo "Control". Solamente las plantas expuestas a una concentración de $30,57\pm 0,01$ mgPb²⁺/L mostraron una disminución significativa de este valor en sus frondas, indicativo de un severo daño a nivel de las membranas (Tabla 2). Sin embargo este efecto fue mayor en lacinias, observándose cambios significativos en este parámetro a partir de la exposición diaria a $2,65\pm 0,07$ mgPb²⁺/L (Tabla 3). Esta diferencia entre frondas y lacinias sugiere una participación más activa de las raíces en la captura y almacenamiento del metal (Hoffman y col., 2004; Leal y col., 2016).

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, fotosintéticamente más activos, protegiéndose así 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 en las plantas se encuentre mayormente vinculada con la pérdida de la integridad de sus raíces.

4. Conclusiones

S. biloba demostró una elevada eficiencia para eliminar Pb²⁺ en muestras de agua contaminadas artificialmente y una importante capacidad para mantener dicha eficiencia en el tiempo. Los parámetros fisiológicos de *S. biloba* se vieron relativamente afectados frente a la exposición aguda al Pb²⁺, siendo en general mayor el grado de afectación a nivel de las lacinias, hecho que sugiere una participación más activa de estos órganos en el proceso de eliminación del metal. Tanto el porcentaje de remoción de Pb²⁺ como su grado de toxicidad fueron dependientes de la concentración del metal y del tiempo de exposición. En resumen, nuestros resultados ponen en evidencia el gran potencial de *S. biloba* para ser utilizada en el saneamiento de aguas contaminadas con Pb²⁺ mediante estrategias de fitorremediación. Por lo tanto, 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.

Agradecimientos

Los autores agradecen muy especialmente a la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario de la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA-campus Rosario) por los fondos suministrados para la ejecución de este proyecto. La Mg. Lic. Kristel Castillo Loría agradece al Programa de Movilidad de la Universidad de Costa Rica por el apoyo económico recibido para la realización de sus estudios de posgrado. La Dra. M.S. Herrero y la Lic. C.D. Bergara desean expresar su gratitud al Vicerrectorado de Investigación de la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA) por los fondos destinados a sus becas de investigación.

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.
- 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.
- 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, 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.
- 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.
- 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.
- McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 277-282.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Pb²⁺ en sistemas de fitorremediación en lotes operados con *Salvinia biloba* Raddi (acordeón de agua). *Energieia*, 13(13), 10-17.
- Wani, A. L., Ara, A., Usmani, J. A. (2015). Lead toxicity: a review. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(2), 55-64.
- 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.