



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Evaluación ecotoxicológica de metales sobre macrófitas acuáticas



Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales

Lic. Ricardo Santiago Martínez

Directores: Dra. María Elena Sáenz – Dra. Susana Edith Freire

Año 2018

Agradecimientos

Llegando al fin de este largo y en absoluto sencillo camino que es el de llevar a cabo un proyecto de doctorado, me doy cuenta que todo el esfuerzo y la energía puesta para recorrerlo valió realmente la pena. Pero por más dedicación individual que se dedique, nunca podría haberlo logrado sin la ayuda, apoyo e incondicionalidad de varias personas a las que me gustaría dedicar unas palabras.

A la Dra. María Elena Sáenz, quiero agradecerle especialmente por aceptar dirigirme en este proyecto, por su inigualable compromiso y responsabilidad. Por confiar en mí y apoyarme durante todo el camino y por sus valiosísimos consejos para mi desarrollo profesional.

Al Dr. Walter Darío Di Marzio, por confiar en mí y permitirme ser parte de este gran grupo de investigación. Por brindarme sus enseñanzas y acercarme al mundo de la ecotoxicología transmitiéndome sus conocimientos y vivencias y por los consejos dados.

A la Dra. Susana Edith Freire, por su excelente predisposición, por su alto grado de profesionalismo y su aporte científico.

A mis padres, que decir de ellos, las palabras solo son suficientes y solo sirven para señalar lo que siento por ellos, pero no para comprenderlo en su totalidad. A ellos gracias por todo el esfuerzo y sacrificio que realizaron para que yo pueda haber llegado hasta acá.

A maxi, mi hermano y compañero. Gracias por siempre estar y hacerme sentir y saber que siempre puedo contar con vos.

Como no agradecerle a Mary, mi novia quien me conoce más que nadie y acepta con mis defectos y virtudes. Por su apoyo incondicional y por su infinito amor.

A mis abuelos, los que viven y los que no, los llevaré siempre en el corazón. Al resto de la familia, tíos y primos. A ellos agradecerles porque sé que siempre podré contar con ellos.

A todos y cada uno de mis amigos, no me atrevo a nombrarlos para no olvidarme de ninguno pero quiero agradecerles a todos de corazón por ser uno de los motores más importantes en mi vida.

A José Luis Alberdi, por sus chistes, sus charlas y su generosidad.

A la Universidad Nacional de Luján, primero por brindarme la educación y luego por brindarme un lugar de trabajo para la realización de mi Tesis doctoral.

A la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar mi Doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca otorgada.

Gracias a todos los que de alguna manera colaboraron y aportaron para la realización de este trabajo.

Índice

Agradecimientos	3
Resumen.....	10
Abstract	15
1. INTRODUCCIÓN	22
2. Hipótesis.....	34
3. Objetivo general	34
4. Objetivos específicos.....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Reactivos utilizados.....	36
5.2 Preparación de las soluciones de metales.....	36
5.3 Determinación analítica de metales.....	37
5.3.1. Determinación de metales en solución.....	37
5.3.2 Limpieza del material de vidrio a utilizar en las determinaciones	37
5.3.3 Preparación de las muestras para determinaciones analíticas de los metales.....	37
5.3.4 Determinación de metales en tejido vegetal.....	38
5.4 Especies de macrófitas acuáticas utilizadas y determinación taxonómica	38
5.5 Obtención de las plantas.....	40
5.6 Condiciones de aclimatación.....	41
5.7 Experiencias realizadas con <i>Lemna gibba</i>	47
5.7.1 Condiciones de mantenimiento de los cultivos	47
5.7.2 Protocolo utilizado en los ensayos de inhibición del crecimiento.....	47
5.7.2.1 Organismo de prueba utilizado.....	47
5.7.2.2 Control de contaminación	48
5.7.2.3 Control de calidad y uniformidad.....	48
5.7.2.4 Exposición.....	49
5.7.2.5 Preparación de las soluciones de prueba	49

5.7.2.6 Duración	50
5.7.2.7 Realización del ensayo	50
5.7.2.8 Estimación de índices de toxicidad	52
5.7.2.9 Diseño experimental de las evaluaciones de los metales estudiados en forma individual	52
5.7.2.10 Determinación de parámetros fisicoquímicos de las soluciones evaluadas	53
5.7.2.11 Diseño experimental de las evaluaciones de mezclas binarias de los metales estudiados	55
5.7.2.12.1 Número de frondes	60
5.7.2.12.2 Peso fresco.....	61
5.7.2.12.3 Caracteres morfométricos.....	62
5.7.2.12.4 Tasa de crecimiento específica.....	66
5.7.2.12.7 Relación frondes/colonias	67
5.7.2.12.8 Contenido en Clorofila “a”, “b” y carotenoides	69
5.7.2.4 Diseño experimental de las evaluaciones de mezclas trinarias de los metales estudiados	72
5.7.2.4.1 Parámetros evaluados	73
5.7.2.4.1.1 Número de frondes	74
5.7.2.4.1.2. Longitud de las raíces.....	74
5.7.2.4.2 Determinación de dosis externa y dosis interna	75
5.7.2.4.3 Análisis de los datos para explicar la interacción tóxica de las sustancias en la mezcla trinaria	77
5.8 Experiencias realizadas con <i>Ceratophyllum demersum</i>	79
5.8.1 Condiciones de mantenimiento de los cultivos stocks	79
5.8.2 Evaluaciones ecotoxicológicas de metales individuales	79
5.8.2.1 Protocolo utilizado en los ensayos de ecotoxicidad	79
5.7.2.1 Organismo de prueba utilizado.....	80
5.8.2.1.1 Cultivos	80

5.8.2.1.2 Medio nutritivo.....	80
5.8.2.1.3 Selección de los ejemplares.....	81
5.8.2.1.4 Aclimatación a las condiciones de ensayo	81
5.8.2.1.4 Preparación de las soluciones de prueba	81
5.8.2.1.5 Exposición.....	82
5.8.2.1.6 Inicio de los ensayos	83
5.8.2.1.8 Duración.....	83
5.8.2.2 Parámetros evaluados	83
5.8.2.2.2 Peso fresco.....	85
5.8.2.2.3 Biomarcadores.....	85
5.8.2.3. Validez de los ensayos	85
5.7.2.4 Estimación de índices de toxicidad	87
5.8.3 Evaluación de bioacumulación de metales.....	87
5.8.3.1 Diseño experimental.....	88
5.8.3.1.1 Selección de las concentraciones de metales.....	88
5.8.3.1.2 Preparación de las soluciones.....	89
5.8.3.1.3 Protocolo de extracción de las plantas	89
5.8.3.1.4 Secado de las plantas.....	90
5.8.3.2 Digestión de las plantas.....	90
5.8.3.3 Determinación analítica del contenido de metales	90
5.9 Experiencia de fitoremediación de metales utilizando macrófitas acuáticas	91
5.9.1 Especies utilizadas.....	91
5.9.2 Diseño experimental.....	91
5.9.3 Determinación de metales en solución y en el tejido vegetal.....	92
5.10 Análisis estadístico	95
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
6.1 Evaluación de la acción de metales sobre <i>Lemna gibba</i>	97

6.1.1 Efectos de los metales en forma individual.....	97
6.1.1.1 Efectos del Níquel	98
6.1.1.2 Efectos del Zn sobre los parámetros evaluados.....	110
6.1.1.3 Efectos del Cadmio sobre los parámetros evaluados	121
6.1.1.4 Análisis integrado de los parámetros evaluados.....	135
6.1.2 Evaluación de mezclas binarias de metales.....	142
6.1.2.1 Efectos de las diferentes proporciones de la mezcla Ni/Zn sobre el crecimiento y biomarcadores	143
6.1.2.2 Análisis de la acción de mezclas binarias Ni/Zn sobre los parámetros evaluados	157
6.1.2.3 Análisis de la interacción Ni/Zn.....	162
6.1.2.4 Efectos de las diferentes proporciones de la mezcla Cd/Zn sobre el crecimiento y biomarcadores	164
6.1.2.5 Análisis de la acción de mezclas binarias Cd/Zn sobre los parámetros evaluados	180
6.1.2.6 Análisis de la interacción Cd/Zn	185
6.1.2.7 Efectos de las diferentes proporciones de la mezcla Cd/Ni sobre el crecimiento y biomarcadores.	189
6.1.2.8 Análisis de la acción de mezclas binarias Cd/Ni sobre los parámetros evaluados.....	204
6.1.2.9 Análisis de la interacción Cd/Ni.....	207
6.1.3 Evaluación de mezclas trinarias	211
6.1.3.1 Mezclas con exposición en medio de cultivo con 0.5 mg/L COD	213
6.1.3.1.1 Análisis de la toxicidad	213
6.1.3.2 Mezclas con exposición en medio de cultivo con 10 mg/L COD	215
6.1.3.2.1 Análisis de la toxicidad	215
6.1.3.3 Capacidad de incorporación de Cd, Ni y Zn en exposiciones individuales y mezclas	217
6.1.3.3.1 Exposiciones con 0.5 mg/L de COD	217
6.1.3.3.2 Exposiciones con 10 mg/L de COD	219
6.1.3.4 Evaluación de la toxicidad de la mezcla trinary utilizando el modelo de concentración aditiva (CA).....	221

6.2. Evaluación de la acción de metales sobre <i>Ceratophyllum demersum</i>	227
6.2.1 Efectos del Ni.....	228
6.2.2 Efectos del Zn.....	233
6.2.3 Efectos del Cadmio	238
6.2.4 Análisis integrado de los parámetros evaluados.....	245
6.2.5 Factor de Bioconcentración para cada metal.....	247
6.2.5.1 Análisis integrado de los ensayos de bioconcentración	256
6.3 Comparación de la acción de los metales estudiados sobre las macrófitas utilizadas.....	257
6.4 Experiencias preliminares de aplicación de macrófitas acuáticas en la fitoremediación de metales.....	259
7. CONCLUSIONES	267
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	272

Resumen

Los ecosistemas acuáticos son los receptores tanto de materia orgánica como de diferentes compuestos artificiales de origen industrial, agrícola y de desecho, provenientes de los ecosistemas terrestres. Las actividades antrópicas generan residuos que contienen sustancias químicas de diversa naturaleza capaces de afectar tanto a los organismos acuáticos como la salud humana, ya que resultan en una mezcla compleja de sustancias orgánicas e inorgánicas, compuestos persistentes y bioacumulables. Los metales son componentes inorgánicos persistentes que forman parte de las aguas residuales generadas por actividades industriales químicas, textiles, galvanoplásticas, cromados, metalúrgicas, papeleras y también por el tratamiento de residuos domésticos, introduciéndose al ambiente en forma de mezclas. Una vez en los sistemas, quedan disponibles en los sedimentos, en la columna de agua o en la materia en suspensión, donde rápidamente son tomados por los organismos residentes, entre ellos los productores primarios. Las macrófitas acuáticas o hidrófitas, constituyen un nivel trófico esencial ya que proveen la energía básica para las redes alimentarias, cumpliendo una importante función en la incorporación y asimilación de nutrientes y energía al ciclo del ecosistema, la oxigenación de las aguas, la estabilización de los sedimentos y proveen de hábitat para una variedad de organismos acuáticos, tanto invertebrados como vertebrados. Los cambios en la dinámica de la comunidad de las hidrófitas de un ecosistema afectarán las comunidades de micro, macroinvertebrados y peces, afectando así todo el ecosistema. Las macrófitas acuáticas resultan fundamentales en la estructura, función y mantenimiento de las características físicas y químicas de los ecosistemas acuáticos, por lo tanto, es sumamente necesario el desarrollo de herramientas para la evaluación ecotoxicológica de sustancias inorgánicas persistentes como los metales. Para una evaluación ecotoxicológica integrada se deben incluir una gama de variables de respuestas que incluyan, el análisis de procesos como el crecimiento, caracteres morfológicos, y también biomarcadores de naturaleza enzimática que actúen sobre moléculas señales que desencadenan diferentes procesos de defensa.

El objetivo del presente trabajo fue realizar una contribución en el desarrollo de herramientas para la evaluación de los efectos tóxicos de elementos metálicos en sistemas biológicos acuáticos, con el fin de ampliar el conocimiento para el diagnóstico ecotoxicológico en plantas vasculares. Los metales estudiados fueron Zinc (Zn), Níquel

(Ni) y Cadmio (Cd), los cuales constituyen los principales metales liberados al ambiente por vía antrópica, evidenciado por poseer los mayores valores de tasa de enriquecimiento antrópico (TEA), respecto a sus valores naturales. Las macrófitas acuáticas estudiadas corresponden a especies flotantes y sumergidas en la columna de agua, *Lemna gibba* (familia Lemnaceae) y *Ceratophyllum demersum* (familia Ceratophyllaceae), respectivamente. Se llevaron a cabo evaluaciones ecotoxicológicas con ambas especies. Para *L. gibba* se estudió la acción sobre distintos parámetros de crecimiento como número de frondes, peso fresco y área total. También se determinaron parámetros morfométricos como son las longitudes de los ejes transversales y longitudinales. Además se evaluaron parámetros bioquímicos como pigmentos (clorofila “a”, clorofila “b” y total de carotenoides), contenido de proteína soluble total y la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa). Los resultados obtenidos en los estudios realizados con *L. gibba*, permitieron concluir que el metal más tóxico basándose en el peso fresco resultó ser el Cd, mientras que si se consideran el área total y el número de frondes, las plantas fueron más sensibles al Ni. Para los tres parámetros de crecimiento evaluados, las plantas resultaron menos sensibles al Zn. Se pudo evidenciar un efecto fitotóxico por parte de los tres metales evaluados individualmente, manifestado por una inhibición del crecimiento cuando se analizó en base las distintas variables de medida y observándose una estimulación del crecimiento para Ni y Zn en las menores concentraciones evaluadas. Como parámetro de evaluación del nivel de desagregación de las plantas, se calcularon las relaciones frondes/colonias para cada metal. Este índice resultó ser más afectado por el Cd. Los tratamientos con los tres metales afectaron en general negativamente el contenido de proteína y de los diferentes pigmentos evaluados, donde solo se observó un pequeño incremento no significativo en las plantas expuestas a Cd para el contenido de clorofila “b” y carotenoides. En cuanto a las actividades enzimáticas se observó en general un incremento de las mismas como resultado de las exposiciones a los distintos metales en bajas concentraciones. Particularmente la GPOX y APOX fueron las que mayor actividad mostraron y las que incrementaron mayormente su actividad respecto de los controles. Además de los ensayos con metales individuales se evaluaron la toxicidad de mezclas binarias y trinarias. Dentro de las primeras, se estudió la acción sobre los parámetros de crecimiento número de fronde y peso fresco, así como los

bioquímicos de contenido proteico y actividad enzimática. Se evaluaron las interacciones por pares de los mismos metales Ni, Zn y Cd. Se evidenció una gran toxicidad en las diferentes combinaciones de concentraciones para las tres mezclas binarias en base a las distintas variables de respuesta obtenidas. El contenido proteico fue afectado negativamente por los tratamientos en las tres mezclas. Se observó además, un efecto sobre la actividad de las distintas enzimas. La relación frondes/colonias resultó más afectada que para el caso de los metales individuales, siendo el efecto tóxico un poco mayor para la mezcla Cd/Zn. El análisis de la interacción de las mezclas binarias de los metales sobre *L. gibba*, permitió definir a la mezcla Ni/Zn como aditiva, la mezcla Cd/Zn como sinérgica, mientras que la mezcla Cd/Ni resultó antagónica. En los estudios de los efectos de la toxicidad de mezclas trinarias, se evaluaron los parámetros de crecimiento número de frondes y la longitud de las raíces. Se realizaron dos experiencias diferentes con concentraciones ambientales, cada una de las cuales con la presencia de diferentes concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) en el medio de cultivo (0.5 y 10 mg COD/L). Luego del período de exposición, se realizó una determinación del contenido de los metales en tejido. Se observó una elevada toxicidad por parte de todas las combinaciones bajo la presencia de ambas concentraciones de COD. En particular el crecimiento de las raíces resultó ser más severamente afectado que el número de frondes, indicando que en estos casos resultaría un parámetro más sensible. La concentración interna fue mayor en los tratamientos individuales que en las mezclas para Cd, Ni y Zn bajo ambas concentraciones de COD. En las mezclas trinarias, el Cd resultó ser el metal que más rápidamente fue incorporado en el tejido vegetal y en mayor concentración, contrariamente a lo observado en las experiencias individuales. Se utilizó el concepto de UT para evaluar si el modelo aceptado *a priori* de Concentración Aditiva (CA), basado en la concentración interna, resulta en un mejor predictor de la toxicidad de la mezcla Cd-Ni-Zn en la planta acuática *Lemna gibba*, que la comúnmente utilizada concentración disuelta. En todos los casos se obtuvieron $\sum UT$ promedio mayores a la unidad, y en general no se observaron valores más cercanos a la unidad al considerar la concentración interna como la dosis de exposición. Por lo tanto la toxicidad de dicha mezcla de metales, no estuvo más cerca de la aditividad por considerar la concentración en tejido que cuando se consideró la concentración externa en solución.

Para las evaluaciones ecotoxicológicas con *Ceratophyllum demersum*, se determinaron distintos parámetros de crecimiento como el peso fresco, la longitud del tallo principal y la longitud total. Además se determinaron parámetros bioquímicos como contenido de proteína total soluble y la actividad enzimáticas de la catalasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa. Los estudios realizados sobre la acción de los metales Zn Ni y Cd en forma individual sobre *Ceratophyllum demersum*, permitieron concluir que el Cd resultó el metal más tóxico para esta especie. En este caso, las plantas expuestas a este metal presentaron clorosis y disgregación de las hojas. Por otra parte, el peso fresco fue el parámetro más sensible, de todos los parámetros evaluados para describir la acción de los metales. La actividad de las enzimas del estrés oxidativo permitió detectar efectos subletales de los metales sobre esta especie, principalmente las enzimas APOX y GPOX. De esta manera estos biomarcadores permiten la detección temprana de efectos, como lo observado en los estudios realizados con *L. gibba*. Se encontraron diferencias de sensibilidad entre las macrófitas evaluadas, ya que el metal menos tóxico resultó el Zn para ambas, pero *L. gibba* presentó más tolerancia. El Cd resultó ser el metal más tóxico para ambas especies, siendo *C. demersum* más sensible que *L. gibba*. El Ni resultó más tóxico para *L. gibba*, presentando mayor tolerancia *C. demersum*. Se realizaron ensayos de bioacumulación de metales individuales con *C. demersum* hallando las cinéticas de incorporación para los tres metales, representadas correctamente por el modelo Michaelis-Menten, donde se observó una mayor capacidad máxima de acumulación para el Zn, mientras que el Cd fue el acumulado en menor concentración.

Se implementó un sistema multiespecífico (*L. gibba*, *Spirodela* sp. y *C. demersum*) y multimetal (Ni, Zn y Cd en forma simultánea) a fin de explorar la potencialidad del uso de estas macrófitas en fitoremediación. Los resultados permitieron concluir que el sistema resultó altamente eficiente, ya que la ecotoxicidad del efluente artificial al final del proceso de fitoremediación se redujo en un 80%, validado mediante ensayos de ecotoxicidad con Cladóceros y microalgas.

La evaluación ecotoxicológica de metales sobre macrófitas que contemplen distintas variables de respuestas como crecimiento y biomarcadores enzimáticos, resulta esencial para la preservación y conservación de los ecosistemas acuáticos, ya que los mismos en forma individual o en mezclas producen efectos adversos. El conocimiento de los

mecanismos involucrados en la toxicidad y tolerancia a los metales puede ser utilizado en tecnologías de fitoremediación de aguas residuales y efluentes industriales.

Abstract

Aquatic ecosystems are receptors of organic matter and different anthropogenic compounds from industrial, agricultural and waste origin coming from terrestrial ecosystems. Anthropogenic activities generate waste containing chemical substances of different nature capable to affect both aquatic organisms and human health, as they result in complex organic and inorganic substances mixtures, bioaccumulative and persistent compounds. Heavy metals are inorganic persistent components that are part of wastewaters generated by chemical, textile, electroplating, chromed, metallurgical and paper industries and also by the treatment of domestic waste, being introduced in environment as mixtures. Once in the systems, are available in sediments, water column or in suspended matter, where rapidly are taken by resident organisms, including primary producers. Aquatic macrophytes or hydrophytes, establish an essential trophic level as they provide much of the basic energy for the food network, developing an important function in the incorporation and assimilation of nutrients and energy to the cycle of the ecosystem, water oxygenation, sediment stabilization and providing habitat and shelter to a variety of aquatic organisms both invertebrates and vertebrates. Changes in hydrophytes community dynamics would affect micro and macroinvertebrates and fishes, influencing the entire ecosystem. Aquatic macrophytes are key components in structure, function and maintenance of physical and chemical characteristics of aquatic ecosystems, then, is extremely necessary developing tools for ecotoxicological assessment of persistent inorganic substances like metals. For an integrated ecotoxicological evaluation, it should be incorporated a range of response variables that include the analysis of processes such as growth, morphometric characters and also enzymatic biomarkers which act over signaling molecules that trigger different defense processes.

The aim of the present work was to realize a contribution in the developing of tools for toxic effects assessment of metallic elements in biological aquatic systems, with the goal of expanding knowledge for ecotoxicological diagnosis in vascular plants. The studied metals where Zinc (Zn), Nickel (Ni) and Cadmium (Cd), which are some of the main metals released into environment by anthropic way, showed by presenting the highest anthropogenic enrichment rate respect natural values. The studied aquatic macrophytes are floating or submerged species in the water column, *Lemna gibba* (Lemnaceae family) and

Ceratophyllum demersum (Ceratophyllaceae family), respectively. Ecotoxicological assessment was carried out with both species. For *Lemna gibba*, the action on different parameters of growth such as frond number, fresh weight and total area were studied. Also, the morphometric parameters such as transversal and longitudinal axes length were determined. Besides, biochemical parameters such as pigments (chlorophyll “a”, chlorophyll “b” and total carotenoids), total protein content and activity of antioxidant enzymes (catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase). Results obtained from studies with *L. gibba*, allowed to conclude that the most toxic metal based in fresh weight was Cd, while plants were more sensitive to Ni when total area and frond number were considered. For the three evaluated growth parameters, plants resulted less sensitive to Zn. A phytotoxic effect by the individual metals was observed, revealed by a growth inhibition when it was analyzed based on the different measurement variables and also was showed a stimulatory effect in growth for the lowest assessed concentration of Ni and Zn. As a disaggregation degree parameter in plants, frond/colony ratio was calculated for each metal. This index resulted more affected by Cd. Treatments with three metal generally affected in a negative way the protein and pigment content, where only a little rise in chlorophyll “b” and carotenoids was observed in plants exposed to Cd. Regarding to enzymatic activities, in general a rise was observed as a result from exposures to low concentrations of metals. Particularly, GPOX and APOX were the ones that showed highest activity and a mayor increase respect controls. Besides individual assessment, toxicity of binary and trinary mixtures was evaluated. For binary mixtures, the effect over the growth parameters frond number and fresh weight was studied, as well as the biochemical ones protein content and enzymatic activity. The interactions by pairs of the metals Ni, Cd and Zn were evaluated. A high toxicity of the different combinations of concentrations for the three binary mixtures based on obtained different response variables was evidenced. Protein content was negatively affected by treatments in the three mixtures. Moreover, it was observed an effect over the different enzymes activity. The frond/colony ratio was more affected than for the case of single metals, being the toxic effect slightly higher for Cd/Zn mixture. The interaction analysis of metals binary mixtures over *L. gibba*, showed that Ni/Zn mixture can be defined as additive, Cd/Zn mixture as synergic, while Cd/Ni resulted antagonist. In the toxicity effects studies of trinary mixtures, the growth parameters frond number and root

length were evaluated. Two separated assays with environmental concentrations of metal were carried out, each one with the presence of 0.5 or 10 mg/L of dissolved organic carbon (DOC) in the culture medium. After exposure period, a tissue metal content determination was realized. A high toxicity of all combinations under both DOC concentrations was observed. Particularly, the root growth resulted more severely affected than frond number, indicating that in these cases would result in a more sensitive parameter. Internal concentration was higher in single treatments than in mixtures for Cd, Ni and Zn for both DOC concentrations. In trinary mixtures, Cd was the more rapid incorporated metal in plant tissue and in higher concentration, contrary to what was observed in single exposures. Toxic Units (TU) concept was used to evaluate if the *a priori* accepted model of Concentration Addition (CA), based in internal concentration, results in a better predictor of the toxicity of the Cd-Ni-Zn mixture in the aquatic plant *Lemna gibba*, than the commonly used dissolved concentration. In all cases the average $\sum TU$ obtained were greater than unity, and in general closer values to unity were not observed by considering internal concentration as exposure dose. Therefore, the toxicity of trinary mixtures was not closer to additivity by considering tissue concentration than when external in solution was considered.

For the ecotoxicological assessments with *Ceratophyllum demersum*, different growth parameters such as fresh weight, main shoot length and total length were determined. Additionally, biochemical parameters such as protein content and enzymatic activity of catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase were determined. The studies over the effects of Zn, Ni and Cd as single metals on *Ceratophyllum demersum*, showed that Cd resulted in the most toxic one for this specie. Plants exposed to this metal showed chlorosis and disintegration of leaves. The fresh weight was the most sensitive parameter from all evaluated for describing the action of metals. Oxidative stress-related enzymes activity allowed detecting sublethal effects of these metals over this specie, mainly APOX and GPOX enzymes. Thus, these biomarkers allow the early detection of effects, like the observed in the studies with *L. gibba*. Different sensitivities between evaluated macrophytes were found, since the less toxic metal for both species was Zn, but *L. gibba* being more tolerant. Cd resulted in the most toxic for both species, being *C. demersum* more sensitive than *L. gibba*. Ni resulted more toxic for *L. gibba*, being *C. demersum* more

tolerant for this metal. Bioaccumulation assays were performed for single metals with *C. demersum* finding the incorporation kinetics for the three metals, correctly characterized by Michaelis-Menten model, where a higher maximum accumulation capacity was observed for Zn, while Cd was accumulated in less extent.

A multispecific system (*L. gibba*, *Spirodela* sp. and *C. demersum*) and multimetal (Ni, Zn and Cd) was performed in order to explore the potentiality for the use of these macrophytes in phytoremediation. Results allow to conclude that the system was highly efficient, since the artificial effluent ecotoxicity was reduced a 80% at the end of the phytoremediation process, validated by ecotoxicity assays with cladoseran and microalgae.

The ecotoxicological assessment of metals over macrophytes contemplating different response variables like growth and enzymatic biomarkers results essential in preservation and conservation of aquatic ecosystems, because these produce adverse effects as single or mixture exposures. The knowledge of involved mechanisms in toxicity and tolerance to metals could be used in phytoremediation technologies for wastewaters and industrial effluents.

Abreviaturas

20X AAP: Algal Assay Procedure medium (medio de cultivo para procedimiento de ensayos con algas concentrado 20 veces)

APOX: Ascorbato peroxidasa

Cd: cadmio

CAT: Catalasa

cm: centímetro

cm²: centímetro cuadrado

CE50: Concentración efectiva 50

CENO: es la máxima concentración evaluada en la cual no se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos controles.

CME0: es la mínima concentración evaluada en la cual se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos control.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBC: Factor de bioacumulación

Fe: hierro

G: fuerza G o fuerza centrífuga relativa

g: gramos

GPOX: Guaiacol peroxidasa

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

hs: horas

HNO₃: Ácido nítrico

L: litro

μ: Tasa de crecimiento

μE*m⁻²s⁻¹: microeinstein sobre metro cuadrado sobre segundo

μl: microlitro

mΩ: microohmio

μS: microsiemens

ml: mililitro

mg: miligramos

M: molar

nm: nanómetro

Ni: níquel

OECD: Organization for Economic Co-operation and development (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico)

ppb: partes por billón

%I_{hb}: Porcentaje de inhibición

%I_r: Porcentaje de inhibición de la tasa

%I_y: Porcentaje de reducción en rendimiento

US EPA: United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)

UT: Unidades tóxicas

UFC: unidad formadora de colonias

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

Zn: zinc

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos son los receptores tanto de materia orgánica como de diferentes compuestos artificiales de origen industrial, agrícola y de desecho, provenientes de los ecosistemas terrestres. Expresan la tensión recibida desde los ecosistemas terrestres de la cuenca que drenan, por lo cual el estado de las aguas epicontinentales de una región refleja también el estado en que se encuentran los ecosistemas terrestres (Margalef 1983; Suter 1993).

Las actividades antrópicas generan residuos que contienen sustancias químicas de diversa naturaleza, capaces de afectar tanto a los organismos acuáticos como la salud humana ya que resultan en una mezcla compleja de sustancias orgánicas e inorgánicas, compuestos persistentes y bioacumulables. La identificación de estas sustancias resulta no solo de gran interés para la protección de la biota acuática, sino fundamentalmente para el cuidado y preservación de la salud pública, ya que una vez vertidas al ambiente comienzan a circular por los compartimentos y reservorios acuáticos (arroyos, ríos, lagunas, napas freáticas, aguas subterráneas). La naturaleza química compleja de las aguas residuales puede ser únicamente caracterizada por valoraciones de índole biológica, ya que la identificación individual de las sustancias componentes no aporta información acerca de la acción sobre sistemas biológicos de manera integrada, posibilitando determinar las acciones sinérgicas y/o antagónicas. Estas aguas residuales son a menudo descargadas en el ambiente sin el apropiado tratamiento, resultando en un severo problema socio-ambiental alrededor de todo el mundo (Fernández et al. 2018; Verma y Suthar 2015; Chaoui et al. 1997; Doğanlar 2013; Dogan et al. 2018; Chorom et al. 2012). Los metales son componentes inorgánicos persistentes que forman parte de las aguas residuales generadas por actividades industriales químicas, textiles, galvanoplásticas, cromados, metalúrgicas, papeleras y también por mineras y el tratamiento de residuos domésticos, introduciéndose al ambiente en forma de mezclas, siendo todas éstas fuentes de contaminación que llegan a los cuerpos hídricos, afectando la calidad del agua y a los organismos que allí viven. La interacción de los componentes de una mezcla puede describirse según los conceptos conocidos como aditividad, sinergismo y antagonismo. En el primer caso se asume que las sustancias en la mezcla ejercen sus efectos tóxicos sin aumentar o disminuir los efectos de los otros

componentes de la mezcla. Los dos últimos hacen referencia a la interacción que resulta que la mezcla sea más o menos tóxica teniendo en cuenta las concentraciones de cada componente en la mezcla y de manera individual, respectivamente. Para describir la aditividad a su vez deben considerarse dos conceptos, Concentración Aditiva (CA) y Acción Independiente (AI). Existen evidencias que demuestran que ambos modelos son adecuados para predecir la toxicidad de las mezclas cuando se conocen las toxicidades individuales de sus componentes (Backhaus y Faust 2009).

La contaminación por metales es uno de los problemas ambientales más significativos en la actualidad, cuyas tres causas principales son la industrialización, agricultura y urbanización (Fernández et al. 2018; Álvarez et al. 2017). Debido a la toxicidad de los mismos, ya que son no degradables y por lo tanto persistentes en la naturaleza, se acumulan en la cadena alimenticia donde con el tiempo alcanzan niveles perjudiciales en los sistemas vivos. La rápida industrialización, el crecimiento de la población y el desarrollo a nivel mundial acelerado ha incrementado enormemente la tasa de liberación de metales y por lo tanto contribuido en la contaminación del medio ambiente (Fernández et al. 2018). La contaminación por metales causada por actividades industriales se ha convertido en una de las amenazas más severas para las poblaciones humanas y de los ambientes acuáticos (Dogan et al. 2018). Entre las actividades industriales más importantes como fuentes de contaminación de metales en el ambiente se pueden destacar las curtiembres, textiles, metalúrgicas, fábricas de galvanizado, refinerías, farmacéuticas y producción de pesticidas y fertilizantes. Las metalúrgicas producen contaminación directa durante la extracción, procesado y utilización de metales, mientras que también pueden contaminar indirectamente por la utilización de combustibles fósiles para las calderas (Bradl 2005). Por su parte las industrias textiles y curtiembres generan efluentes altamente contaminados que alcanzan los cursos de agua llegando a afectar áreas remotas (Bhuiyan et al. 2010). La actividad minera, catalogada como actividad del sector primario, produce por cada gramo de mineral extraído gran cantidad de roca residual que contiene una baja concentración de metales pesados, los cuales pueden movilizarse por lixiviación alcanzando aguas superficiales y subterráneas (Li et al. 2015). Las prácticas agrícolas como el uso de pesticidas y fertilizantes también contribuyen en la contaminación por metales, ya que estos se pueden encontrar como impurezas en dichos productos (Wuana y Okieimen 2011). La

urbanización genera por su parte grandes cantidades de basura, aguas residuales y lodos de depuradora, los cuales son fuentes de contaminación de metales pesados (Fernández et al. 2014). Asociado con la urbanización, se encuentra cada vez una mayor generación de desperdicios electrónicos, el cual surge como un problema emergente, ya que contienen gran cantidad de metales que son liberados al ambiente cuando estos materiales son tratados incorrectamente (Wu et al. 2015; Huang et al. 2016).

Por lo tanto, la contaminación causada por la amplia utilización mencionada de metales pesados en diferentes aplicaciones, principalmente industriales, así como una contaminación proveniente de actividades agrícolas, vertederos municipales y aguas residuales conlleva a una distribución mundial en suelos, limo, residuos, aire, aguas naturales y organismos vivos (Álvarez et al. 2017; Fernández et al. 2014). Si bien algunos metales cumplen una importante función como micronutrientes, cuando se encuentran en altas concentraciones producen efectos adversos en los organismos impactando y afectando el funcionamiento y estructura de los ecosistemas (US EPA 2004a).

Encontramos elementos metálicos en todos los organismos, algunos de estos son esenciales (micronutrientes) y su deficiencia resulta en el deterioro de funciones biológicas que son llevadas a cabo por los mismos. Sin embargo, los metales esenciales también pueden resultar tóxicos cuando los organismos se encuentran ante una exposición excesiva de éstos. En cuanto a los roles que llevan a cabo en las células, se puede destacar la estabilización de estructuras biológicas, formar parte de componentes de mecanismos de control, formación de pigmentos y enzimas y en particular como activadores o componentes del sistema redox. El Ni, por ejemplo, tiene un importante rol en el metabolismo de la ureasa (Khellaf y Zerdaoui 2010). La deficiencia de Ni inhibe la acción de la ureasa lo que conlleva a la acumulación de urea provocando la presencia de manchas necróticas en las hojas (Seregin y Kozhevnikova 2005), mientras que un exceso de este metal ha demostrado causar inhibición del crecimiento de plantas expuestas (Khellaf y Zerdaoui 2010; Parnian et al. 2016; Drost et al. 2007; Gautam et al. 2017), una modificación en el contenido de pigmentos fotosintéticos con efectos sobre la estructura del sistema tilacoidal (Appenroth et al. 2010), desbalance de la actividad de diferentes enzima antioxidantes (Yilmaz y Parlak 2011; Seregin y Kozhevnikova 2005). El Ni y compuestos de níquel, presentan muchos usos industriales y comerciales, por ejemplo usos en la

producción de acero inoxidable, en otras aleaciones de Ni con resistencia a la corrosión y a la temperatura, amplio uso en la metalúrgica, química e industrias de procesamiento de comidas especialmente como catalizadores y pigmentos, mientras que entre las sales de Ni de mayor importancia comercial se pueden mencionar el cloruro, sulfato, nitrato, carbonato, hidróxido acetato y óxido de Ni; otros causantes de que el Ni pueda llegar al ambiente es como resultado de la combustión del carbón, del diesel y del fueloil, la incineración de residuos y agua residuales (Cempel y Nikel 2006).

El Zn por su parte, es requerido para activar muchas enzimas y participa en el mantenimiento del correcto funcionamiento y estructura de membranas (Wang et al. 2009; Gautam et al. 2017). Sin embargo en concentraciones que exceden la óptima se ha observado una inhibición del crecimiento en plantas (Megateli et al. 2009; Khellaf y Zerdaoui 2009; Gautam et al. 2017). Entre los efectos tóxicos observados por exceso de concentración de Zn en plantas se ha mencionado clorosis, que puede ser inducida por deficiencia de Fe^{+2} (debido a su similar radio con Zn^{+2}), también puede provocar deficiencia de otros elementos esenciales como P, Mn y Cu (Yadav 2009). Se ha observado que este metal puede producir alteraciones en las cantidades de pigmentos fotosintéticos, del contenido proteínas y en la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (Parlak y Yilmaz 2012; Radic 2009). Entre las utilidades más importantes del Zn que contribuyen a su amplia utilización y dispersión en el medio ambiente se destacan muchos tipos de minerales que contienen este metal donde uno de los comercialmente más importantes es la esfalerita (sulfuro de Zn) mientras que el óxido de Zn es uno de las más empleados compuestos de este metal en la industria; además el Zn es ampliamente utilizado como revestimiento protector de otros metales, en fundición de metales para moldear, en la industria de la construcción, para aleaciones resistentes a la corrosión, en pilas secas, en la industria del caucho así como también compuestos orgánicos con Zn se utilizan ampliamente como fungicidas, antibióticos tópicos y lubricantes (Sandstead y William 2007)

Otros metales no tienen funciones esenciales conocidas, como el caso de Cd, y producen manifestaciones tóxicas cuando la incorporación en los tejidos aumenta moderadamente con respecto a una situación “normal” (Souza et al. 2011; Hou et al. 2007; Gomes-Junior et al. 2006). El Cadmio es un contaminante ambiental ampliamente extendido, considerado de

extrema significancia debido no solo a su alta toxicidad para los organismos, sino también a su alta solubilidad en agua, facilitando esto su gran distribución en los ecosistemas acuáticos (Li y Xiong 2004). Entre los distintos efectos observados en plantas producidos por exposiciones a Cd se destacan inhibición del crecimiento, la reducción en la fotosíntesis, decrecimiento de la eficiencia de la cadena transportadora de electrones, inhibición de la síntesis de clorofila, desbalance en la actividad de enzimas antioxidantes, reducción en la incorporación de agua y nutrientes, así como visibles síntomas de daño como clorosis, inhibición del crecimiento, amarronamiento de las puntas de las raíces y muerte de los organismos (Yadav 2009; Cherif et al. 2011; Kaoud et al. 2011; Dogan et al. 2018; Halaimi et al. 2014; Hou et al. 2007). El Cd, al igual que los demás metales trabajados aquí, presenta varias aplicaciones industriales como la galvanoplastia, pigmentos, estabilizantes, baterías, aleaciones y fundiciones entre otras; siendo su extendida presencia en el ambiente, no solo debido a la actividad industrial, sino también debido a las actividades agrícolas y mineras (Prasad et al. 2001; Hou et al. 2007).

El grado de toxicidad depende del elemento metálico y de su biodisponibilidad (Nordberg et al. 2007, Kumar et al. 2013). La toxicidad causada por metales esta atribuida principalmente por una interacción directa con proteínas dada por una alta afinidad por grupos tiol, histidilo y carboxilo, provocando que los metales interaccionen con sitios estructurales, catalíticos y de transporte de la célula, también la toxicidad de éstos es atribuida a la generación de especies reactivas del oxígeno que modifican el sistema de defensa antioxidante y pueden provocar estrés oxidativo o a un desplazamiento de los cationes esenciales de sus sitios de unión específicos en diferentes proteínas causando que colapsen las funciones de las mismas (Sharma y Dietz 2009).

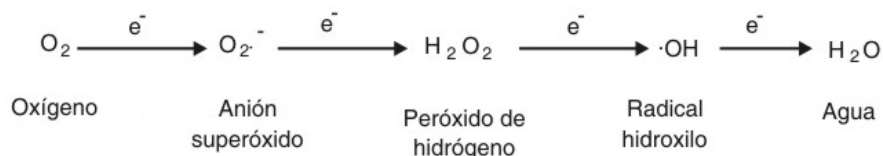
Los efectos de los metales en los ecosistemas acuáticos, pueden ser evaluados mediante cambios en la estructura de la comunidad, actividad fisiológica y componentes de ultraestructura de las macrófitas (Guilizzoni 1990).

En los organismos en general y en las plantas en particular, se producen normalmente como parte de los procesos metabólicos aeróbicos como respiración y fotosíntesis, especies reactivas del oxígeno (EROs) en organelas como mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas (Apel y Hirt 2004; Gechev et al. 2005; Sharma y Dietz 2009). Estos EROs tienen la capacidad de causar daño oxidativo sobre distintos componentes celulares como proteínas,

ADN y lípidos, pudiendo causar de esta manera daños irreversibles que conllevan a la necrosis de tejidos y en última instancia a la muerte del organismo (Griffiths 2005). El daño oxidativo provoca alteraciones en caminos metabólicos y daño a macromoléculas (Hegedus et al. 2001). Cabe destacar que las mencionadas EROs no solo ejercen funciones negativas dentro de las células, sino que son moléculas que continuamente están siendo producidas dentro de las mismas, incluso en condiciones normales, donde tienen un importante rol como señales intermediarias en un gran número de procesos celulares, especialmente en relación a interacciones con el ambiente (Gill y Tuteja 2010; Gechev et al. 2005). La producción y eliminación de estas moléculas oxidantes debe estar estrictamente controlada, y para ello han evolucionado distintos complejos de detoxificación enzimáticos y no enzimáticos (Demidchik 2015). Los sistemas antioxidantes están ampliamente distribuidos entre los organismos con el fin de resolver la oxidación de las moléculas y sus consecuencias. La energía invertida en estos sistemas ayuda a prevenir los efectos deletéreos y además es un mecanismo de defensa contra la muerte celular. Una red compleja de metabolitos antioxidantes y enzimas detoxifican las EROs y peróxidos de lípidos en varios compartimentos celulares como, cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Rosenwasser et al. 2011). Dicha compleja red de reacciones que protegen las células del estrés oxidativo está conformada básicamente por antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular (glutación, ascorbato, tocoferol, cisteína), enzimas de reaccionan directamente con las especies reactivas del oxígeno (superóxido dismutasa, glutación peroxidasa, catalasas, ascorbato peroxidasa, guaiacol peroxidasa) y por otras enzimas que catalizan reacciones que mantienen a diferentes antioxidantes en sus formas reducidas (glutación reductasa) (Mullinoux et al. 2008; Yadav 2009). El estrés oxidativo es un fenómeno químico y fisiológico complejo que está relacionado tanto a estrés biótico como abiótico, y se desencadena como resultado de la sobreproducción y acumulación de especies reactivas del oxígeno, las cuales una vez producidas pueden ser removidas, modificadas, inducir señalización o daños en las células vegetales (Møller et al 2007). El estrés oxidativo puede ser resultado de una exposición incrementada a oxidantes o por un decrecimiento en la protección frente a oxidantes, incluso ambas cuestiones pueden ocurrir simultáneamente, causando un amplio espectro de respuestas genéticas, metabólicas y celulares (Davies 2005). La mayoría de las condiciones que generan estrés oxidativo

modulan la expresión génica, pueden estimular el crecimiento o causar un cese temporario del crecimiento y de la división celular como una respuesta adaptativa transitoria (Davies 2005). El equilibrio entre la producción y eliminación de las especies reactivas del oxígeno puede ser perturbado por muchos factores abióticos, como la presencia de algunos contaminantes, que pueden exacerbar o desbalancear la producción éstas (Apel y Hirt 2004).

Los metales pesados son un ejemplo de estos contaminantes que pueden incrementar la producción de especies reactivas del oxígeno (Rivera-Cabrera et al. 2008). Uno de los primeros efectos en las plantas, luego de una exposición a elevadas concentraciones de metales pesados, es la generación de EROs las cuales pueden ser producidas directamente mediante la reacción Haber-Weiss (que es catalizada por Fe^{3+}) o de una forma más indirecta que involucra la interacción de los metales con el sistema antioxidante, disrupción de la cadena transportadora de electrones o perturbando el metabolismo de elementos esenciales (Yadav 2009). Entre las principales causas del aumento en la producción de EROs por exposición a metales, se encuentra la interacción de estos con las actividades del transporte de electrones en membranas de cloroplastos y mitocondrias. En condiciones normales aproximadamente el 2% del O_2 consumido, que normalmente es reducido produciendo H_2O , es usado para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A pesar de que el oxígeno no es de ninguna manera el único agente oxidante a la cual las células y los organismos están expuestos, es sin duda el más ubicuo (Davies 2005). El O_2 es un biradical por tener dos electrones sin aparear, pero al tener estos el mismo *spin* impide que este reaccione directamente con otros compuestos. Sin embargo, el oxígeno en estado fundamental puede ser convertido en especies mucho más reactivas (EROs) mediante una reducción univalente del O_2 , es decir, la adición de electrones individuales paso a paso, proceso que involucra la producción de especies parcialmente reducidas del O_2 , y puede observarse en el siguiente esquema. Por su parte, el oxígeno en estado fundamental (también llamado oxígeno triplete) puede mediante la transferencia de energía formar oxígeno singlete, el cual también es mucho más reactivo que el primero (Yadav y Sharma 2006; Apel y Hirt 2004; Gill y Tuteja 2010).



El oxígeno en estado fundamental es levemente oxidante, mientras que el oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y especialmente el radical hidroxilo son oxidantes fuertes. Mientras que por su parte, el radical superóxido, que generalmente es la primer ERO producida, es menos reactivo y tiene un tiempo de vida corto por lo que no puede atravesar la membrana plasmática, pero puede formar rápidamente H_2O_2 por dismutación o formar el radical hidroxilo por protonación o por donar el electrón desapareado al Fe^{3+} produciendo Fe^{2+} en unas reacciones que involucran también al H_2O_2 (reacciones Haber-Weiss) (Davies 2005; Camarena-Gutiérrez 2006; Gill y Tuteja 2010). El H_2O_2 tiene la característica de ser altamente estable y es capaz de difundir por las membranas ya que es soluble en lípidos inactivando moléculas incluso a muy bajas concentraciones (Shahid et al. 2014).

Por todo lo mencionado, se considera de importante relevancia el estudio de los antioxidantes en la evaluación de los efectos tóxicos causados por contaminantes, ya que proveen información esencial del estado redox de las células (Foyer 2005).

En este trabajo se evaluó la actividad de tres de las enzimas más importantes en la detoxificación del H_2O_2 , las cuales son ascorbato peroxidasa (APOX), guaiacol peroxidasa (GPOX) y catalasa (CAT) en plantas expuestas a metales pesados. Medir el cambio fisiológico ayuda a identificar el modo de acción e inferir desviaciones del funcionamiento óptimo.

Los metales pesados tanto en suelos, aguas y aire significan una amenaza creciente para el medio ambiente. Las aguas son el destino final de los metales contaminantes, donde la mayor contribución es por descargas de origen antropogénico. En cuanto al comportamiento de los metales en los ecosistemas acuáticos, este está conectado al rol llevado a cabo por la materia orgánica disuelta presente por procesos como sorción o quelación de los metales, debido al amplio número de grupos funcionales por ejemplo de los ácidos húmicos y fúlvicos que permiten la unión a los metales en solución produciendo una posible reducción de la toxicidad de los mismos (Guilizzoni 1990). Una vez en los sistemas, quedan disponibles en los sedimentos, en la columna de agua o en la materia en

suspensión, donde rápidamente pueden ser tomados por los organismos residentes, entre ellos los productores primarios. Las macrófitas acuáticas o hidrófitas, constituyen un nivel trófico esencial ya que proveen la energía básica para las redes alimentarias. Como resultado, muchos cuerpos de agua dulce están siendo afectados y alterados. Los metales pueden llegar al ambiente acuático por descarga directa, aunque también por lixiviación o por lavado de suelos contaminados. La entrada de estos contaminantes puede afectar la calidad del agua causando serios problemas para todos los organismos, y su bioacumulación a través de la cadena alimenticia puede llegar a representar un riesgo incluso para el ser humano (Harguinteguy et al. 2015; Li y Xiong 2004).

Dentro del ambiente acuático, las macrófitas contribuyen significativamente en la producción primaria en cuerpos de agua formando parte fundamental de la estructura trófica de estos ecosistemas. En los ecosistemas acuáticos, las macrófitas pueden actuar como sumidero de materiales que llegar al cuerpo de agua (Guilizzoni 1990). Frente al importante desafío de la restauración y protección ambiental, surge el desarrollo de métodos adecuados para la limpieza de los ambientes contaminados (Amoroso et al. 2013). En este sentido los métodos basados en tecnologías fisicoquímicas de remoción de metales como por ejemplo ósmosis reversa, procesos electroquímicos, intercambio iónico y adsorción en carbón activado son costosos, requieren mucha energía y equipamiento específico además de no asegurar una remoción completa. En consecuencia, se ha vuelto necesaria la búsqueda de tecnologías más baratas y efectivas para el desarrollo de métodos de remoción más económicos, seguros y ambientalmente amigables, donde la remoción biológica surge como una alternativa conveniente (Fernández 2018; Halaimi et al. 2014; Hou et al. 2007; Maine et al. 2009; Chorom et al. 2012). La bioremediación es una tecnología de bajo impacto en el ambiente y es apropiada para aplicaciones a gran escala en ambientes heterogéneos, como aguas subterráneas, lodos del suelo, aguas residuales y residuos industriales (Polti et al. 2011). Por lo tanto, los métodos biológicos son recomendados como una alternativa eficiente, sustentable y en armonía con el medio ambiente, para la remoción y recuperación de metales desde las soluciones acuosas. La biomasa de las plantas acuáticas representa una fuente biológica abundante que posee una inmensa capacidad de acumular metales pesados, siendo por lo tanto explotados en el mundo entero en el marco de las tecnologías del tratamiento de aguas residuales. Las

macrófitas acuáticas se han utilizado en estudios de bioremediación de sedimentos, toxicidad de elusiones de distinto origen, tratamientos terciarios de efluentes industriales, toxicidad de drenajes provenientes de la actividad agrícola, lixiviados de residuos peligrosos, rellenos sanitarios y desechos de plantas municipales y cloacales (Sáenz et al., 1998; Sáenz et al., 2003; Lovett Doust et al., 1994). Las especies más frecuentemente utilizados en fitoremediación corresponden a *Vallisneria* sp., *Pontederia* sp. *Ceratophyllum demersum*, *Myriophyllum spicatum*, *Hydrilla verticillata*, *Lemna* sp, *Typha* sp, y *Eichhornia crassipes*, *Spartina* sp, *Cyperus* sp *Eryngium* sp. (Zazo et al., 2008; Akhtar et al., 2005; Susarla et al., 2002; Singhal and Rai, 2003; Lin y Mendelssohn 2008; Rezanian et al. 2016; Yadav et al. 2018; Vatta et al. 1995). Las plantas acuáticas tiene la capacidad de incorporar grandes cantidades de metales durante la recirculación de nutrientes, por absorción mediante raíces u hojas desde los sedimentos o desde la columna de agua siendo de esta forma buenos centinelas de los sistemas acuáticos (Harguinteguy et al. 2014). Las tasas de incorporación de dichos metales en las plantas varían en gran medida con la concentración relativa del elemento en el ambiente, la forma de crecimiento de la planta, el espesor de la cutícula, los tipos de mecanismos de absorción, la afinidad de los metales por los sitios de adsorción, la especiación de los metales, la estabilidad de los mismos y las constantes con los ligandos (Guilizzoni 1990).

Las especies pertenecientes a la familia Lemnaceae son un grupo de plantas distribuidas mundialmente en agua dulce y estuarios salobres que se han utilizado ampliamente en investigaciones ecotoxicológicas de tóxicos ambientales en ambientes acuáticos (Sobrero et al. 2004) y se han incorporado en protocolos estandarizados por agencias de protección ambiental u organizaciones (US EPA 1996; Environment Canada 2007; OECD 2006). Las plantas de este grupo (en su conjunto llamadas lentejas de agua), son especies ampliamente distribuidas tanto en zonas tropicales como templadas y cálidas de todo el mundo. Son importantes en el ambiente que ocupan ya que son alimento de aves acuáticas y pequeños animales; también proveen refugio para una gran variedad de invertebrados (Wang 1991). Han sido utilizadas frecuentemente en estudios ecotoxicológicos ya que tienen algunas características que las hacen adecuadas para evaluación en condiciones de laboratorio como por ejemplo su pequeño tamaño, facilidad con la que se pueden cultivar y manipular y una tasa de crecimiento rápida (Dirilgen 2011; Basile et al. 2015; Demim et al 2013). La

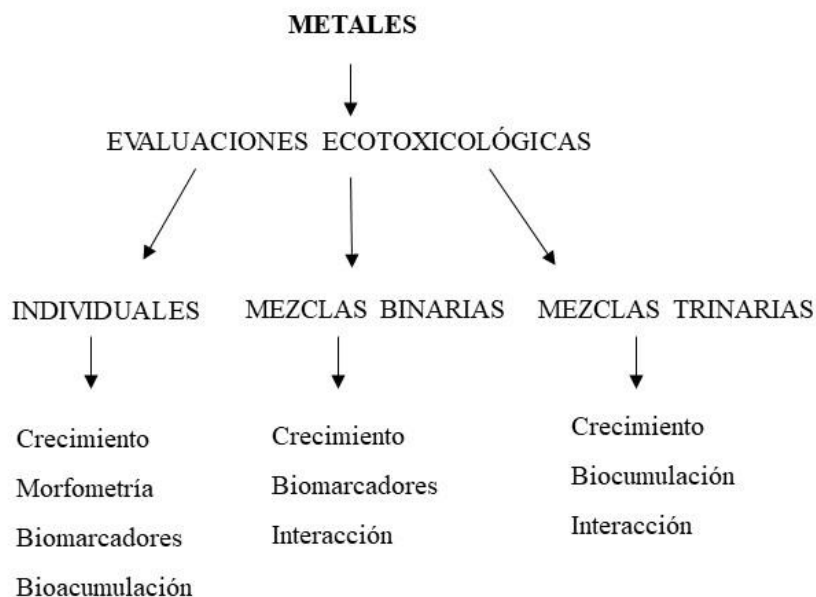
incorporación de los elementos esenciales desde el agua en estas plantas flotantes se realiza tanto por las raíces como por las hojas o frondes. La especie *Ceratophyllum demersum*, es de distribución cosmopolita en regiones desde templadas hasta tropicales, presenta un rápido crecimiento en cuerpos de agua con flujo más bien lento, poco profundos y lodosos (Abbas 2017; Andresen et al. 2013). Es una especie sumergida perenne que no posee raíces pudiendo vivir libres en flotación o ancladas en sustratos por unos tallos enterrados especializados finamente divididos a los que se los conoce como brotes rizoides (DiTomaso et al. 2013). La incorporación de elementos esenciales en esta especie es principalmente mediante sus hojas finamente divididas por carecer de raíces (Guilizzoni 1990). Esta característica hace de esta especie ventajosa para la utilización en ensayos de toxicidad en laboratorios por evitar la complicación del continuo suelo-raíz y el particionamiento de la acumulación de metales en sistema radical y en sistema del vástago, siendo considerada de esta manera como un modelo biológico apropiado para el estudio del estrés por metales (Aravind et al. 2009). De hecho esta especie ya se ha utilizado en procesos de remediación de aguas contaminadas con metales (Fawzy et al. 2012; Chen et al. 2015).

Existe una necesidad de realizar evaluaciones de riesgo ambiental asociado a la exposición de metales y la determinación de estándares regulatorios a fin de establecer niveles seguros de para los ecosistemas naturales (US EPA 2002; US EPA 2007). Los cambios en la dinámica de la comunidad de las hidrófitas de un ecosistema afectarán las comunidades de micro, macroinvertebrados y peces, afectando así todo el ecosistema (Belgers et al. 2007; Thomaz y Cunha 2010). Las macrófitas acuáticas son fundamentales en la estructura y función y en el mantenimiento de las características físicas y químicas de los ecosistemas acuáticos, ya que por ejemplo cambios importantes en la concentraciones de oxígeno, carbono inorgánico, pH y alcalinidad pueden resultar de su metabolismo, por lo tanto no deben faltar en los procesos de evaluación de riesgo de las sustancias químicas que pueden contaminar el ambiente (Thomaz y Cunha 2010). Para una completa evaluación de una gama amplia de xenobióticos es aconsejable el uso de un grupo de especies de macrófitas, ya que existen diferencias de sensibilidad, pero además de una gama de variables de respuestas que incluyan, procesos integrales como el crecimiento, y también biomarcadores de naturaleza enzimática que actúen sobre moléculas señales que desencadenan diferentes procesos de defensa y detoxificación (Lahive et al. 2011; Parlak y Yilmaz 2012, 2013;

Cobbet 2000; Van Breusegem et al. 2001; Benavides *et al.* 2005; Moller et al. 2007). La incorporación de las macrófitas a la batería de organismos utilizados para la evaluación ecotoxicológica de sustancias puras o que formen parte de diferentes matrices líquidas y sólidas con componentes orgánicos e inorgánicos y en estudios de evaluación de riesgo de sustancias químicas, adquiere un significado ecológico relevante, permitiendo además el desarrollo de normas relacionadas a la protección de estos organismos, que resulten de referencia y soporte para las legislaciones presentes y futuras (Matlby et al. 2010; Feiler et al. 2012). Estos estudios potencialmente pueden aplicarse en futuros lineamientos relacionados a la legislación de liberación a ambientes acuáticos, establecimiento de niveles de riesgo ecológico, como así también criterios en el manejo, remoción y disposición final de metales.

En la presente tesis se evaluaron los efectos de los metales Zinc, Níquel y Cadmio sobre una macrófita flotante y una sumergida, realizando estudios sobre el crecimiento, caracteres morfométricos y bioquímicos. Se estudió la acción de los metales en forma individual y en mezclas binarias y trinarias como así también estudios sobre su bioconcentración explorando la potencialidad de las macrófitas en fitoremediación de aguas residuales y efluentes industriales.

En el siguiente esquema se presenta un resumen de las experiencias y evaluaciones realizadas en este trabajo de tesis doctoral.



2. Hipótesis

- El análisis integrado de variables morfométricas, crecimiento y biomarcadores enzimáticos describen la acción tóxica de metales sobre macrófitas acuáticas.
- La tolerancia a la acción de los metales se debe a procesos combinados de bioacumulación y de modificación de la actividad de las enzimas relacionadas al estrés oxidativo.

3. Objetivo general

- El objetivo general de este estudio fue evaluar el riesgo ecotoxicológico de metales sobre macrófitas acuáticas flotantes y sumergidas mediante el uso de diferentes variables de respuesta, identificando las especies más vulnerables.

4. Objetivos específicos

- Definir la toxicocinética de la biocumulación y acción de metales individuales sobre macrófitas acuáticas.
- Verificar la posibilidad de aplicar las macrófitas acuáticas con mayor eficiencia y tolerancia a fin de ser utilizadas en la remoción de metales (fitoremediación).
- Establecer criterios de peligrosidad de vertido de metales a ambientes acuáticos continentales respecto a la acción sobre macrófitas acuáticas, teniendo en cuenta la evaluación integrada de las distintas variables de respuesta, poblacionales, biomarcadores y bioacumulación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos utilizados

Todos los reactivos utilizados fueron de grado y pureza analítica. Los utilizados para preparar las soluciones de metales, tanto el ZnCl_2 (cloruro de zinc) como el $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de níquel (II) hexahidratado) fueron de la marca Biopack®, mientras que el $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (cloruro de cadmio monohidratado) fue de la marca Anedra®. Los reactivos utilizados para preparación de los medios de cultivo serán detallados en la sección 5.6.

5.2 Preparación de las soluciones de metales

Las soluciones de metales, tanto para los ensayos con *Lemna gibba* como con *Ceratophyllum demersum*, fueron preparadas a partir de soluciones stock. Las mismas fueron preparadas para cada ensayo, disolviendo los reactivos mencionados en la sección anterior, en agua ultrapura calidad Milli-Q.

El agua Milli-Q utilizada en el presente trabajo fue obtenida a partir de un equipo de purificación HF-Super serie PW, con filtro de 0,2 μm . Las características químicas de la misma se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características químicas del agua Milli-Q

Parámetro	Valor
Resistividad ($\text{m}\Omega \times \text{cm}$)	18,2
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	0,055
COT (ppb)	<10
Partículas 0,22 μ	< 1/mL
Bacterias	1 UFC/mL

La concentración de dichas soluciones stock dependió de las concentraciones finales de los metales a evaluar en cada uno de los ensayos de toxicidad, donde no se añadió más del 2% del volumen final.

5.3 Determinación analítica de metales

5.3.1. Determinación de metales en solución

Todos los valores de concentraciones indicados en esta Tesis no son los valores nominales; en su lugar se indican los valores determinados analíticamente en las soluciones de metales. Para los tres metales, según la sensibilidad necesaria, estas determinaciones fueron llevadas a cabo mediante espectroscopía de absorción atómica utilizando llama aire-acetileno (según Método #3111; APHA 1998) u horno de grafito (según Método #3112B; APHA 1998). El límite de detección para estos metales fue de 0.05 mg/L.

El equipo utilizado fue un espectroscopio de absorción atómica marca Perkin Elmer modelo Analyst 200. Las diferencias entre concentraciones medidas y nominales variaron entre el 1 – 9 %.

5.3.2 Limpieza del material de vidrio a utilizar en las determinaciones

Especial atención se prestó en la limpieza del material empleado para contener y manipular las soluciones para medir metales. Todo material utilizado fue sumergido en HNO_3 al 5% durante 24 hs, luego se realizó un doble enjuague con agua corriente, un enjuague con agua destilada, uno con agua bidestilada y finalmente un doble enjuague con agua ultra pura calidad Milli-Q.

5.3.3 Preparación de las muestras para determinaciones analíticas de los metales

Al momento de comenzar los ensayos, se tomó una muestra de las soluciones iniciales de cada concentración y control, en los recipientes preparados según el procedimiento de limpieza descrito con anterioridad. Además, se tomaron también muestras luego de 7 días al finalizar los ensayos. Estas soluciones, tanto iniciales como finales, fueron primero filtradas al vacío con papel de filtro, luego se procedió a la acidificación de las mismas con una o dos gotas de HNO_3 de pureza analítica hasta la obtención de un $\text{pH} \leq 2$. Finalmente fueron guardadas a 4°C en los recipientes correctamente preparados, hasta el momento de ser analizadas.

5.3.4 Determinación de metales en tejido vegetal

Para la determinación del contenido de metales en los tejidos vegetales al finalizar los ensayos, se procedió al secado de las plantas en estufa de vacío a 110°C y 50 cmHg por dos horas. Una vez obtenido el material seco, se precedió con una digestión ácida por microondas. Para ello, las plantas fueron colocadas en los tubos de teflón del rotor del microondas marca “Anton Paar” modelo “Multiwave 3000”. Junto con el material vegetal se añadieron 5 ml de HNO₃ concentrado de pureza analítica. El programa de digestión consistió en una rampa inicial de 10 minutos hasta llegar a 800 W de potencia, seguido de una meseta a esta misma energía durante 10 minutos (Método #3052; US EPA 1996a). Una vez enfriados los tubos, se trasvaso el contenido a viales de vidrio y se guardó a 4°C hasta su determinación. Las determinaciones se realizaron mediante espectroscopia de absorción atómica por llama en espectrómetro marca Perkin Elmer modelo Aanalyst 200 (Método #3111B; APHA 1998).

La preparación de las muestras vegetales para la determinación de metales, será explicada con mayor detalle más adelante en las secciones 5.7.2.4.4 y 5.8.3.2 para *Lemna gibba* y *Ceratophyllum demersum* respectivamente.

5.4 Especies de macrófitas acuáticas utilizadas y determinación taxonómica

Para el presente trabajo se utilizaron dos especies de plantas acuáticas vasculares, también llamadas macrófitos acuáticos o hidrófitos. Las mismas son *Lemna gibba* y *Ceratophyllum demersum*. Las mismas fueron identificadas mediante una determinación taxonómica que se realizó en el Jardín Botánico y Arboretum "Carlos Spegazzini" (UNLP); con la supervisión de la Dra. Susana Edith Freire utilizando como referencias los textos de Cabrera (1968), Cabrera y Zardini (1978), Tur (2008), Landolt (1986), Landolt y Kandeler (1987) y de Landolt y Zarzycki (1994).

Lemna gibba

Esta especie pertenece a la familia de las Lemnaceae, grupo que está comprendido plantas acuáticas monocotiledóneas diminutas con distribución cosmopolita (Azer 2013, Tur 2008). Las especies de esta familia se caracterizan por ser hidrófitas flotantes libres en la superficie del agua o inmediatamente por debajo de la misma, con cuerpos taloides

reducidos a pequeñas frondes u hojas. Las distintas especies de esta familia pueden tener entre 1 a 21 raíces, que nacen en la cara inferior de la fronde o carecer de ellas, son simples y no tienen pelos radicales. Presentan entre 1 a varias frondes unidas entre sí, las cuales pueden ser gruesas o delgadas de 0.5-15 mm de longitud y 0.3-10 mm ancho, de color verde hasta casi transparentes y a veces rojizo, pudiendo tener tejido aerenquimático entre la epidermis superior e inferior (Tur 2008). La inflorescencia es de tipo espádice, formada por una flor femenina y dos masculinas, originada en uno de los bolsillos y las flores emergen desde el borde del mismo, con espata, desplegada o cerrada en forma de tubo (Cabrera 1968). Rara vez se encuentran plantas florecidas, por lo que en la mayoría de los casos solo las características vegetativas son las disponibles para su identificación. Las frondes hijas son originadas vegetativamente a partir de meristemas ubicados en el interior de 1-2 bolsillos o en una cavidad en la base de la fronde madre. Son plantas cosmopolitas, encontradas en regiones templadas y cálidas de todo el mundo y en la Argentina desde Jujuy hasta la Patagonia, siendo muy frecuente en la provincia de Buenos Aires.

Ceratophyllum demersum

Esta especie pertenece a la familia cosmopolita de plantas de agua dulce Ceratophyllaceae. Entre las características de esta familia se destaca la presencia de flores unisexuales, actinomorfas, desnudas, protegidas por 9-12 brácteas, masculinas y femeninas en nudos separados; las flores masculinas con 10-20 estambres dispuestos en espiral sobre el receptáculo, las femeninas con ovario súpero, unicarpelar y unilocular con un solo óvulo anátropo, péndulo. Fruto aquenio con estilo persistente formando un pico. Esta familia está conformada por especies de hierbas perennes sumergidas libres, sin raíces, con tallos delgados y hojas verticiladas sésiles sin estípulas, divididas dicotómicamente. Está conformada por un solo género, *Ceratophyllum* (Cabrera 1968; Cabrera y Zardini 1978).

La especie utilizada, *Ceratophyllum demersum*, es una hierba con tallos ramosos cilíndricos, de 30 a 100 cm de longitud y de hasta 2 mm de diámetro. Ampliamente distribuida en regiones templadas y tropicales; muy presente en arroyos y lagunas de la provincia de Buenos Aires (Cabrera 1978).

Se incluye a continuación una clave para identificación y caracteres diagnósticos de las macrófitas usadas en el estudio según Cabrera y Zardini (1978) y Valdés et al. (1987):

1. Plantas flotantes con cuerpos taloides reducidos a pequeñas frondes. Raíz solitaria

Lemna

Frondes obovado-orbiculares, de 3.2-6 mm de long., muy gibosas en la cara interior, gruesas, con 3-5 nervaduras, nervadura media conspicua y laterales poco visibles. Óvulos

2-7.....*Lemna gibba*

1'. Plantas sumergidas. Raíces ausentes. Hojas verticiladas divididas dicotómicamente en segmentos lineares, rígidos, últimas divisiones con dientes agudos en el margen.

Ceratophyllum

Aquenio liso, con larga espina terminal encorvada de hasta 15 mm de long y otras 2 espinas en la base. Hhojas bifurcadas 1-2 veces *Ceratophyllum demersum*

5.5 Obtención de las plantas

Los ejemplares de ambas especies utilizados en los ensayos ecotoxicológicos fueron conseguidos de estanques artificiales mantenidos en el campo de la Universidad Nacional de Luján. Dichos estanques permanecen libres de cualquier tipo de contaminación antrópica y con una renovación permanente del agua de los mismos con el fin de evitar la disminución de las concentraciones de oxígeno disueltos, conservar la transparencia del agua y reducir la proliferación algal y fúngica. Las plantas retiradas de estos estanques fueron llevadas al laboratorio, donde previamente a ser colocadas bajo las condiciones de aclimatación, fueron lavadas de forma suave pero profunda primero bajo una corriente continua de agua de grifo y luego con agua destilada esterilizada. Una vez limpias, se procedió a la aclimatación en condiciones de laboratorio. En una habitación climatizada de 25 mts cuadrados, donde la temperatura se mantiene constante durante todo el año. El fotoperiodo e intensidad lumínica se adaptó a las necesidades de cada especie, mediante el uso de tubos LED colocados en placas móviles con interruptores individuales y controladores de los intervalos de tiempo con luz-oscuridad.

5.6 Condiciones de aclimatación

Al menos tres semanas antes del comienzo de los ensayos, las plantas fueron transferidas al laboratorio para permitir su aclimatación a las condiciones de realización de los ensayos de ecotoxicidad.

Lemna gibba

Para el caso de la especie *Lemna gibba*, se siguió el protocolo 221 de “Evaluación de la Inhibición del Crecimiento sobre *Lemna sp.*” de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, por su sigla en Inglés) publicado en 2006 como parte de las “Directrices para la Prueba de Productos Químicos” (OECD, 2006). Los cultivos de aclimatación se iniciaron en recipientes de plástico de 30 cm x 30 cm donde las plantas formaban una capa sobre la superficie del agua (Figura 1). Estos recipientes contenían medio nutritivo y fueron mantenidos a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz blanco frío en un rango de intensidad entre $85\text{-}135 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (equivalente a 6500-10000 lux) para una radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm); con un fotoperiodo de 16:8 h luz-oscuridad (OECD, 2006).



Figura 1. Cultivos stock de *Lemna gibba* en laboratorio

El medio nutritivo utilizado fue el 20X AAP (Algal Assay Procedure) (OECD, 2006) ya que es el recomendado en el protocolo para cultivo y ensayo con *Lemna gibba*. A continuación se detalla la constitución del medio:

Se prepararon 4 (cuatro) soluciones nutritivas correspondientes a macronutrientes y 2 (dos) solución de micronutrientes. La constitución, para 1 (un) Litro cada una de ellas, se detalla a continuación:

Macronutrientes:

Solución 1:

MgCl ₂ .6H ₂ O	12 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4 g
NaNO ₃	26 g

Solución 2:

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	15 g
---	------

Solución 3

K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1.4 g
--	-------

Solución 4

NaHCO ₃	15 g
--------------------------	------

Micronutrientes:

Solución 5

H ₃ BO ₃	0.19 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.42 g
ZnCl ₂	3.3 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	1.4 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7.3 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.012 mg

Solución 6

FeCl ₃ .6H ₂ O	159.6 mg
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	300 mg

Cada una de las soluciones fue preparada en un litro de agua bidestilada estéril con las cantidades de los reactivos recién especificadas. El medio de cultivo, utilizado tanto para la aclimatación como para mantenimiento y los ensayos, se preparó agregando a un recipiente con 850 ml de agua bidestilada, 20 ml de cada una de las soluciones (menos de la Solución 6). El pH de la misma se ajustó a 7,5 usando 0,1 ó 1 M HCl ó NaOH y se autoclavó a 1 atm por 15 min. Luego de esto, se agregó 1 ml de la solución stock Fe-EDTA, la cual no puede

ser autoclavada para evitar la degradación del EDTA. Se realizó una modificación del medio de cultivo que consistió en la separación de los compuestos $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de la solución de micronutrientes original y la inclusión de las mismas en una solución aparte. La razón de este procedimiento es que se ha demostrado la mitigación de la toxicidad de metales presentes en solución sobre *Lemna* sp. por parte del EDTA (Huebert et al. 1993). Éste, con sus cuatro posiciones acetato y dos amino, puede combinarse con iones de metales pesados por la generación de enlaces coordinados generando complejos no iónicos llamados quelatos. Estos quelatos se utilizan principalmente para mantener el Fe en solución, ya que sería el micronutriente más crítico. La constante de formación del complejo Fe-EDTA es aproximadamente 25,1 que es muchos órdenes de magnitud mayor que para otros cationes en el medio (Huebert y Shay 1991). Basándose en esta propiedad, la modificación incluida en el medio de cultivo, tuvo como objetivo diseñar una composición en la cual la relación Fe-EDTA utilizada minimice la cantidad de EDTA libre (no asociada a Fe) controlando las propiedades quelantes y evitando así interferencias con los demás cationes presentes en la solución, entre ellos los metales evaluados. Por lo tanto, el agregado de 1 ml de esta solución permitió obtener una relación molar óptima entre el Fe y EDTA, levemente mayor a 1 (OECD 2006), a fin de prevenir la precipitación de este elemento y minimizar el efecto quelante del EDTA. De esta manera la concentración final en el medio nutritivo preparado resultó de 0.59 μM para el Fe y 0.80 μM para el EDTA.

Finalmente, el medio final se llevó a volumen final de 1 Litro con agua bidestilada. El medio de cultivo se preparó al menos 1 ó 2 días antes de su utilización para permitir su estabilización; momento en el cual el pH fue chequeado y reajustado en caso de ser necesario. En la Tabla 2 se detallan las concentraciones finales de los nutrientes en el medio de cultivo.

Tabla 2. Concentraciones finales en el medio de cultivo 20X AAP de cada nutriente y elemento.

Macronutrientes	Concentración final en medio (mg/l)	Elemento	Concentración final en medio (mg/l)
NaNO ₃	510	Na;N	190;84
MgCl ₂ ·6H ₂ O	240	Mg	58.08
CaCl ₂ ·2H ₂ O	90	Ca	24.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	290	S	38.22
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	30	K;P	9.4;3.7
NaHCO ₃	300	Na;C	220;43
Micronutrientes			
H ₃ BO ₃	3.7	B	0.65
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8.3	Mn	2.3
FeCl ₃ ·6H ₂ O	159 µg/L	Fe	33 µg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	257 µg/L	--	--
ZnCl ₂	66 µg/L	Zn	31 µg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	29 µg/L	Co	7.1 µg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	145 µg/L	Mo	58 µg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.24 µg/L	Cu	0.08 µg/L

Ceratophyllum demersum

Para el caso de la especie *Ceratophyllum demersum*, se siguió el protocolo TG 238 “Test de toxicidad libre de sedimento con *Myriophyllum spicatum*” de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD de su sigla en Inglés) publicado en 2014 como parte de las “Directrices para la Prueba de Productos Químicos” (OECD, 2014). Entre las características más favorables que hacen de la especie utilizada un buen modelo para investigar la acción de los metales en condiciones de laboratorio, se puede destacar una alta tasa de propagación vegetativa así como la ausencia de raíces que simplifica la interpretación de los resultados (Aravind et al. 2009).

Se seleccionaron plantas jóvenes y libres de daños aparentes para cultivos de aclimatación en condiciones de laboratorio. Para esto, se colocaron en acuarios de vidrio con medio nutritivo mantenidos en una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz blanco frío en un rango de intensidad entre $100\text{-}150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para una radiación fotosintéticamente activa (400-700

nm); con un fotoperiodo de 16:8 h luz-oscuridad. Se mantuvo una aireación constante de las peceras (Figura 2) (OECD, 2014).

El medio nutritivo empleado fue el Medio Andrew Modificado (OECD, 2014).

Se prepararon 3 (tres) soluciones nutritivas correspondientes a macronutrientes y 2 (dos) solución de micronutrientes. La constitución, para 1 (un) Litro cada una de ellas, se detalla a continuación:

Macronutrientes:

Solución 1:

KCl 74.6 mg
KNO₃ 8.08 mg
Ca(NO₃)₂·4H₂O 18.88 g

Solución 2:

MgSO₄·7H₂O 9.86 g

Solución 4:

KH₂PO₄ 2,72 g

Micronutrientes:

Solución 3:

Se colocaron 10 ml de la solución 3.1 y se llevó a 1 L final con agua bidestilada.

Solución 3.1 (para 100 ml):

MnSO₄·4H₂O 0,223 g
ZnSO₄·7H₂O 0,115 g
H₃BO₃ 0,155 g
CuSO₄·5H₂O 0,0125 g
(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,0037 g

Solución 5:

FeCl₃·6H₂O 159.6 mg
Na₂EDTA·2H₂O 300 mg

Cada una de las soluciones fue preparada en un litro de agua bidestilada estéril con las cantidades de los reactivos especificadas. Para la conformación del medio de cultivo de aclimatación, se colocaron 50 ml de las soluciones 1, 2, 3 y 4 en un recipiente de 5 L y se llevó a volumen con agua bidestilada. El pH de la misma fue ajustado a 5.8 usando 0,1 ó 1 M HCl ó NaOH y se autoclavó a 1 atm por 15 min. Luego de esto, se agregó 5 ml de la

solución 5. El medio de cultivo se preparó al menos 1 ó 2 días antes de su utilización para permitir su estabilización; momento en el cual el pH fue chequeado y reajustado en caso de ser necesario.

Las modificaciones del medio nutritivo consistieron, por un lado, en la utilización de la solución reducida en EDTA (la misma que fue empleada en el medio de cultivo de la especie *Lemna gibba*), a fin de evitar la interacción con los metales y por el otro, en la eliminación de la sacarosa, ya que ésta ocasionaba importantes dificultades en el mantenimiento de cultivos libres de contaminación. Los cultivos se contaminaban en breve tiempo con hongos y bacterias impidiendo la realización de los ensayos y ocasionando daños visibles en el desarrollo de las plantas. A fin de determinar si este nutriente era fundamental para el desarrollo saludable de las plantas, se realizaron comparaciones de tasas de crecimiento entre poblaciones de plantas con el medio con sacarosa y en ausencia del mismo, al cabo de 14 días de incubación. Los resultados obtenidos permitieron concluir que las tasas de crecimiento entre las distintas poblaciones no diferían entre sí, encontrándose además que las plantas incubadas en ausencia de sacarosa presentaban valores de las tasas de crecimiento similares a las informadas en la bibliografía (Hyldgaard et al. 2012, Hyldgaard et al. 2014, Pan et al. 2009, Xing et al. 2016).

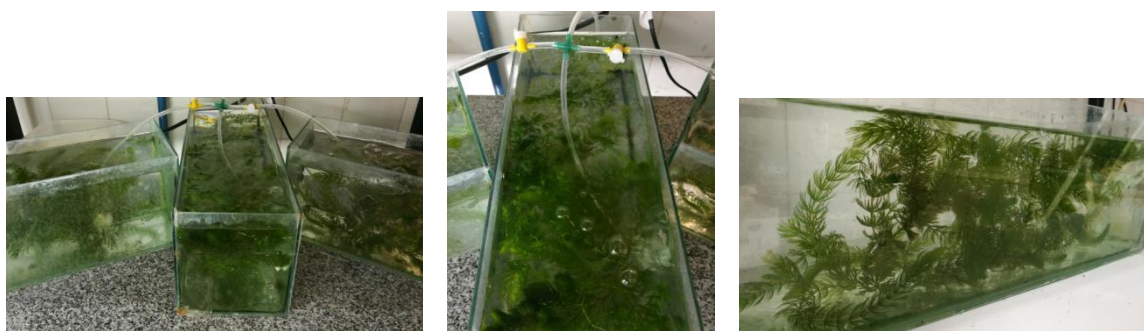


Figura 2. Plantas de los cultivos stock de *Ceratophyllum demersum* en peceras con aireación

5.7 Experiencias realizadas con *Lemna gibba*

5.7.1 Condiciones de mantenimiento de los cultivos

A partir de las plantas aclimatadas en condiciones de laboratorio, se transfirieron periódicamente plantas jóvenes y sanas a medio de cultivo nuevo en recipientes de plástico de 30 cm x 30 cm. Las condiciones físico-químicas de incubación de los cultivos de mantenimiento, fueron iguales que los mencionados para el período de aclimatación. Frente a la presencia de signos de contaminación, se procedió a la esterilización superficial de un subgrupo de frondes, las cuales fueron transferidas a medio de cultivo fresco, descartando el resto del cultivo contaminado. Para reducir la frecuencia del mantenimiento de los cultivos (por ejemplo cuando no se realizaron ensayos por cierto período) estos se mantuvieron en condiciones reducidas de luz y temperatura (4 - 10°C).

Una semana antes del comienzo de un ensayo, una cantidad suficiente de plantas fueron trasferidas asépticamente a medio de cultivo nuevo autoclavado en recipientes de vidrio idénticos a los que se utilizaron para los ensayos (Erlenmeyers de 250-ml) y se modificó el fotoperiodo a 24 hs de luz continua.

5.7.2 Protocolo utilizado en los ensayos de inhibición del crecimiento

La evaluación de la fitotoxicidad de los metales sobre *Lemna gibba* se llevó a cabo mediante la determinación de los efectos sobre el crecimiento y fisiología de los ejemplares expuestos, siguiendo las recomendaciones del protocolo OECD (2006).

Los ensayos realizados que permitieron estimar la toxicidad de los metales en plantas *L. gibba* fueron estáticos con una duración de 7 días.

5.7.2.1 Organismo de prueba utilizado

Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento con la especie *Lemna gibba* mediante la exposición de esta especie a distintas concentraciones de los metales Zinc, Níquel y Cadmio. Esta especie pertenece a la División Magnoliophyta, Clase Liliopsida, Orden Alismatales, Familia Lemnaceae. Pertenece al grupo de las denominadas lentejas de agua.

Ensayos de sensibilidad

Previamente a la realización de las evaluaciones se realizaron ensayos de sensibilidad de los organismos mediante la exposición a una sustancia de referencia como el dicromato de potasio (ETC 2007). Esta prueba de sensibilidad permitió validar la respuesta obtenida en los bioensayos asegurando la calidad de los resultados y la precisión de los análisis generados a partir de los mismos. Para realizar estos ensayos se preparó medio de cultivo (20X AAP) con concentraciones de 3.5 - 7 - 14 - 28 y 56 mg $K_2Cr_2O_7/L$. Estos fueron preparados tomando alícuotas de una solución madre de 100 mg Cr/10 ml H_2O . Los controles consistieron en exposiciones en el mismo medio de cultivo sin el agregado de dicromato. Los ensayos fueron realizados por duplicado en Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo tratado o control. La CE-50 7 días para el dicromato de potasio se mantuvo entre 10 y 30 mg/L cumpliendo con el criterio de validez de sensibilidad (ETC 2007).

5.7.2.2 Control de contaminación

Las plantas utilizadas para ser empleadas como inóculos en los ensayos de fitotoxicidad fueron seleccionadas de los cultivos de mantenimiento (sección 5.7.1). Las plantas elegidas estaban libres de contaminación por otros organismos como algas, hongos y protozoos. Se utilizaron plantas sanas de tres o cuatro frondes.

5.7.2.3 Control de calidad y uniformidad

Como se mencionó previamente, se emplearon como plantas inóculo aquellas libre de contaminación, que tuvieran una apariencia saludable sin lesiones ni decoloración (clorosis) aparentes y con presencia de tres o cuatro frondes. Debido a que la calidad y homogeneidad de las plantas utilizadas puede tener una influencia significativa en los resultados de los ensayos, previo a su utilización, las plantas fueron analizadas de acuerdo a criterios establecidos, a fin de asegurar la utilización de un conjunto uniforme de organismos. Como criterio para seleccionar un pull de plantas de un tamaño uniforme para ser utilizado en los ensayos, se establecieron distintos valores umbrales teniendo en cuenta el promedio del área de los frondes y longitud de ejes longitudinal y transversal de 250 plantas.

Estos valores umbrales de los parámetros morfométricos mencionados fueron:

Área de las frondes: entre 2 y 5.7 mm²

Longitud eje longitudinal: entre 1.6 y 3.1 mm

Longitud eje transversal: entre 1.5 y 2.5 mm

Por lo tanto, las plantas se mantuvieron en las condiciones de cultivo hasta alcanzar o encontrarse dentro de los intervalos indicados para cada magnitud, ya que por debajo de los mismos no podían ser utilizadas en los ensayos ecotoxicológicos.

5.7.2.4 Exposición

Plantas sanas consistentes en tres a cuatro frondes fueron seleccionadas como inóculos y asignadas y colocadas al azar y asépticamente en los distintos recipientes controles y tratados. Cada recipiente contuvo al inicio de los ensayos un total de 12 frondes. Los recipientes en los cuales se llevaron a cabo las exposiciones fueron Erlenmeyers de 250-ml conteniendo 100 ml del medio de cultivo, autoclavados a 1 atmósfera durante 15 minutos. Aunque la luz y la temperatura fueron homogéneas en toda la superficie donde se llevaron a cabo las experiencias, se implementó un diseño aleatorio para la ubicación de los recipientes control y tratados al momento de la incubación para minimizar la influencia de las diferencias espaciales en intensidad lumínica y temperatura. Además, se llevó a cabo un reordenamiento periódico también aleatorio. Se utilizó un luxímetro (Extech Light Meter) a fin de controlar la exposición de los recipientes a las mismas condiciones de intensidad lumínica.

El medio de cultivo empleado en los ensayos de ecotoxicidad fue el mismo que para el mantenimiento de los cultivos, es decir el 20X AAP. Tanto los controles como los tratados en todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.7.2.5 Preparación de las soluciones de prueba

Las exposiciones consistieron en el medio de cultivo con el agregado de distintas concentraciones de metales, definidos estos como los tratados o tratamientos. El medio de cultivo cumple con todos los requerimientos nutritivos necesarios para un correcto crecimiento y desarrollo de los organismos testeados, de manera que cualquier efecto de inhibición del crecimiento se le puede atribuir al contenido de metal añadido. La preparación de las soluciones de prueba fueron diferentes, según se tratara de evaluaciones

de los metales en forma individual o en forma de mezclas, las mismas se detallaran en los apartados correspondientes.

5.7.2.6 Duración

La duración de las experiencias fue de 7 días y las condiciones de incubación fueron controladas a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una intensidad lumínica entre 6500 a 10000 Lux proveída mediante luz blanca fría con un fotoperiodo de 24 hs de luz.

5.7.2.7 Realización del ensayo

Como se mencionó anteriormente, se utilizaron tres réplicas por cada una de las concentraciones mencionadas para cada metal y por cada control. Las experiencias comenzaron cuando un inóculo de plantas jóvenes, de tamaño uniforme según los criterios establecidos y sin daño aparente, se colocaron en los Erlenmeyer, ya conteniendo el medio de cultivo control o tratado autoclavado, bajo las condiciones experimentales detalladas a continuación. La incorporación de las plantas al medio se realizó bajo flujo laminar de manera de mantener las condiciones de esterilidad.

Al finalizar los ensayos se determinaron diferentes parámetros de crecimiento, morfológicos y bioquímicos; a saber: número de frondes, peso fresco, área total, longitud de ejes longitudinal y transversal, contenido de pigmentos (clorofila “a”, “b” y carotenoides), contenido total de proteínas y actividad enzimática de la catalasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa. Cada uno de ellos serán detallados más adelante.

Resumen de las condiciones de realización de los ensayos de ecotoxicidad:

La figura 3 muestra como lucían las plantas dentro de los recipientes durante el transcurso de un ensayo.

Tabla 3. Condiciones de los ensayos con *Lemna gibba*

Tipo de ensayo: Estático

Temperatura: 24 ± 2

Calidad de luz: blanca fría

Intensidad de luz: 6500 a 10000 Lux

Fotoperiodo: 24 hs luz

Inóculo inicial: 12 frondes

Medio de cultivo: 20X AAP

pH inicial del medio: 7.5

Número de réplicas: 3

Duración del ensayo: 7 días

Efecto medido: crecimiento y parámetros bioquímicos



Figura 3. Ensayo en transcurso donde plantas de *Lemna gibba* son expuestas bajo las condiciones de incubación.

5.7.2.8 Estimación de índices de toxicidad

Existen diferentes índices que permiten cuantificar la respuesta obtenida durante el desarrollo de un ensayo para evaluar la toxicidad de una sustancia determinada. El índice de toxicidad universalmente utilizado para cuantificar la toxicidad aguda es la concentración efectiva 50 (CE50). El mismo permite cuantificar el efecto relacionado a una sustancia en particular y está definido como la concentración de una sustancia que provoca un efecto de disminución del 50 % en un determinado parámetro evaluado después de un periodo de exposición específico. En el caso de los ensayos de mayor duración que abarcan todo o parte del ciclo de vida de la especie prueba, se pueden determinar otros índices tales como:

CENO: es la máxima concentración evaluada en la cual no se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos controles.

CME0: es la mínima concentración evaluada en la cual se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos control.

Estos índices están incorporados en la mayoría de los protocolos estándares, como por ejemplo aquellos generados por la US EPA (1996b, 1996c, 1996d, 2002a, 2002b).

El protocolo OECD (2006) para evaluaciones con *Lemna* sp. previamente mencionado, aconseja el número de frondes como parámetro más significativo para la estimación de estos índices, pero también alguna otra variable estudiada. En el presente trabajo, se calcularon los índices CE50, CENO Y CME0 a los 7 días de exposición, en base al número de frondes y en base al peso fresco y área total.

5.7.2.9 Diseño experimental de las evaluaciones de los metales estudiados en forma individual

Se llevaron a cabo evaluaciones de la toxicidad de tres metales evaluados individualmente. Los mismos fueron: Cadmio (Cd), Níquel (Ni) y Zinc (Zn). Se diseñaron experiencias con concentraciones crecientes de cada uno de los metales. El rango de concentraciones para cada uno fue determinado en base a experiencias preliminares y datos bibliográficos. Las experiencias preliminares consistieron en exposiciones en un rango amplio de concentraciones (0.01 a 100 mg/L). Todos los reactivos utilizados fueron de grado y pureza analítica. Las soluciones de exposición fueron preparadas desde una solución madre

concentrada de cada uno de los tres metales. Las soluciones madre se lograron mediante la dilución de los siguientes reactivos en agua bidestilada. El reactivo utilizado para los ensayos con Zn fue el ZnCl_2 (cloruro de zinc); para los de Ni fue el $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de níquel (II) hexahidratado), ambos estos de la marca Biopack®. Mientras que se utilizó $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (cloruro de cadmio monohidratado) de la marca Anedra® para preparación de la solución madre de los ensayos con Cd. Las concentraciones de las soluciones madre fueron: 125 mg Cd/100 ml – 80 mg Ni/100 ml y 2000 mg Zn/100 ml.

Las concentraciones finales de exposición del Zn fueron: 2.3 - 4.6 - 9.2 - 20.1 - 36.7 - 74.6 - 183 - 284 - 587 mg Zn/L. Las concentraciones evaluadas de Ni fueron: 0.18 - 0.37 - 0.92 - 1.46 - 3.61 - 6 - 11.82 mg Ni/L. Mientras que las concentraciones de Cd fueron de 0.13 - 0.26 - 0.52 - 1.03 - 2.06 - 4.13 - 8.26 - 16.51 - 33 mg Cd/L.

5.7.2.10 Determinación de parámetros fisicoquímicos de las soluciones evaluadas

Para las soluciones utilizadas como controles y las soluciones de prueba de cada uno de los metales se determinaron los parámetros: pH, dureza, alcalinidad y conductividad.

pH

El pH de las soluciones evaluadas se determinó utilizando un pH metro de mesa OAKTON, modelo 1100. El mismo fue calibrado con soluciones estándar Biopack® de pH 4, 7 y 10. Para las determinaciones, los electrodos de pH y temperatura fueron introducidos en el seno del líquido y se registró la medición una vez estabilizada la lectura.

Dureza

La dureza total se determinó según el método 2340 C (APHA 1998). Para ello se colocó 1 ml de solución reguladora pH=10 a 10 ml de la muestra a determinar, también se añadieron 2 gotas de sulfuro de sodio 10% y 2 gotas del indicador eriocromo-T. Dentro de los 5 minutos posteriores se tituló con EDTA ($f = 0.9568$), hasta lograr un viraje de color del rojo-púrpura al azul. El volumen de EDTA utilizado en la titulación fue empleado para calcular la dureza según:

$$\text{dureza} = \text{ppm de CaCO}_3 = \text{Vol. EDTA} * f * 100$$

donde f es la valoración del EDTA, que representa cuantos mg CaCO_3 equivale a 1 ml de EDTA.

Alcalinidad

La determinación de la alcalinidad se realizó según el método de titulación 2320 B (APHA 1998). Para ello, se agregaron a 10 ml de la muestra a determinar, 4 gotas de solución de fenolftaleína; en caso de producirse un viraje de color a rosado se tituló con H_2SO_4 0.02N hasta decoloración. Luego a la misma muestra se le agregaron 4 gotas de solución de bromocresol y se tituló nuevamente con H_2SO_4 0.02N hasta viraje de color azul a salmón. Estos volúmenes fueron utilizados para el cálculo de la alcalinidad:

Si el volumen para fenolftaleína fue igual a cero entonces:

$$\text{alcalinidad} = \text{HCO}_3^- = \text{Volumen utilizado para bromocresol} * 100$$

Si el volumen para fenolftaleína < volumen para bromocresol entonces:

$$\text{alcalinidad} = \text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^- = (2 * \text{vol. fenolftaleína} * 100) + ((\text{vol. bromocresol} - \text{vol. Fenolftaleína}) * 100)$$

Conductividad

La conductividad de las soluciones evaluadas fue determinada mediante la utilización de un electrodo multifunción para calidad del agua marca Horiba modelo U-10. Para las determinaciones, el electrodo fue introducido en el seno del líquido y se registró la medición una vez estabilizada la lectura. (Método #2510B APHA 1998).

Estos parámetros para el medio utilizado como control se indican en la Tabla 4. Las soluciones de prueba de cada uno de los metales estudiados presentaron valores similares a las soluciones controles (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros físico-químicos del medio nutritivo utilizado como control.

pH	Conductividad (mS/cm)	Dureza (ppm CO ₃ Ca)	Alcalinidad (mg/L)
7.5	1.55	354	156

5.7.2.11 Diseño experimental de las evaluaciones de mezclas binarias de los metales estudiados

Se diseñaron experiencias con el fin de evaluar las interacciones por pares de los mismos metales evaluados individualmente. Para ello, se prepararon las siguientes tres mezclas binarias: Ni-Zn; Cd-Zn y Cd-Ni. Con el fin de analizar la interacción de los metales en la mezcla, se aplicó el modelo de la Concentración Aditiva (CA) utilizando un concepto adimensional llamado Unidades Tóxicas (UT), que se define como la relación entre la concentración de la sustancia en la mezcla y la concentración que se necesita para causar un determinado efecto evaluado en forma individual. El enfoque de las Unidades Tóxicas es uno de los modelos más comúnmente utilizados para evaluar la toxicidad de mezclas químicas (Wu et al. 2017). Para cada mezcla se evaluaron distintas proporciones de Unidades Tóxicas (UT) de los metales.

En principio se postula que la interacción de las sustancias en la mezcla seguirá el modelo de la Concentración Aditiva (CA), el cual responde a la relación:

$$\sum_{i=1}^n \frac{Ci}{CEXi} = 1$$

Donde C_i es la concentración de la sustancia i en la mezcla respecto de su Concentración Efectiva ($CEXi$) o sea su toxicidad de manera individual. Visto de otra forma si la mezcla sigue el modelo aditivo la suma de sus UT debe ser = a 1. La ecuación anterior es equivalente a:

$$CEX_{mezcla} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{CEXi} \right)^{-1}$$

Donde p_i es igual a $\sum_{i=1}^n p_i = 1$

O sea la fracción del compuesto i en la mezcla. El modelo CA asume que un componente arbitrario en la mezcla puede ser intercambiado por otro con el mismo modo de acción sin modificar la toxicidad total de la misma ya que su concentración expresada como UT permanece igual.

Las unidades toxicas para un metal en una mezcla fueron calculas como:

$$TU = C_i / CE50_i$$

donde C_i corresponde a la concentración del tóxico i en la mezcla, y $CE50_i$ es la concentración efectiva media del tóxico i evaluado individualmente. Puede calcularse la suma de las UT de cada metal en la mezcla permitiendo obtener una expresión de la exposición estandarizada por el efecto (Bundschuh et al. 2014). Si la $\sum UT = 1$ entonces los componentes en la mezcla siguen el modelo de adición (no hay interacción). Las interacciones son definidas como desviaciones de la aditividad esperada o efectos, basados en el concepto de CA como referencia. Las interacciones pueden resultar en mayores (sinergismo) o menores (antagonismo) toxicidades en la mezcla que las esperadas cuando el metal se encuentra en forma individual. De esta manera las interacciones se definen como sinérgicas (más efecto que aditivas, en la mezcla la sustancia es más tóxica que en forma individual, la $\sum UT < 1$; cuando se presenta menos efecto que aditivas (en la mezcla la sustancia es menos tóxica que en forma individual), la interacción es antagónica, la $\sum UT > 1$ (Calamari y Alabaster 1980; Sharma et al 1999; Mowat y Bundy 2002).

Los metales con similares modos de acción suelen ser aditivos, mientras que aquellos con distinta forma de acción son considerados no aditivos. Según Calamari y Alabaster (1980) generalmente las interacciones ocurren en tres niveles de acción:

- Existen interacciones químicas con los componentes del medio
- Interacciones con los procesos fisiológicos del organismo durante la incorporación
- Interacciones a nivel del sitio de acción tóxica

En este trabajo se evaluaron tres proporciones de UT para cada mezcla binaria, que fueron: 0.67:0.33 – 0.5:0.5 – 0.33:0.67. Para cada una de estas proporciones, se prepararon cinco combinaciones de concentraciones de los metales.

Las tablas 5, 6 y 7 muestran las concentraciones correspondientes a cada UT para las tres relaciones de cada una de las mezclas binarias.

Tabla 5. Concentraciones nominales (mg/L) de los metales para la mezcla binaria Ni-Zn y los valores de UT correspondientes para cada una de las proporciones.

Concentración Ni	Concentración Zn	UT	
0.67	0.33		
6,77	102,31	2,67	1,33
3,39	51,15	1,33	0,67
1,69	25,58	0,67	0,33
0,85	12,79	0,33	0,17
0,42	6,39	0,17	0,08
Concentración Ni	Concentración Zn	UT	
0.5	0.5		
5,08	153,46	2,00	2,00
2,54	76,73	1,00	1,00
1,27	38,37	0,50	0,50
0,64	19,18	0,25	0,25
0,32	9,59	0,13	0,13
Concentración Ni	Concentración Zn	UT	
0.33	0.67		
3,35	205,64	1,32	2,68
1,68	102,82	0,66	1,34
0,84	51,41	0,33	0,67
0,42	25,70	0,17	0,34
0,21	12,85	0,08	0,17

Tabla 6. Concentraciones nominales (mg/L) de los metales para la mezcla binaria Cd-Ni y los valores de UT correspondientes para cada una de las proporciones.

Concentración Cd	Concentración Ni	UT	
0.67	0.33		
47,87	3,39	2,67	1,33
23,93	1,69	1,33	0,67
11,97	0,85	0,67	0,33
5,98	0,42	0,33	0,17
2,99	0,21	0,17	0,08
Concentración Cd	Concentración Ni	UT	
0.5	0.5		
35,90	5,08	2,00	2,00
17,95	2,54	1,00	1,00
8,98	1,27	0,50	0,50
4,49	0,64	0,25	0,25
2,24	0,32	0,13	0,13
Concentración Cd	Concentración Ni	UT	
0.33	0.67		
23,69	6,81	1,32	2,68
11,85	3,40	0,66	1,34
5,92	1,70	0,33	0,67
2,96	0,85	0,17	0,34
1,48	0,43	0,08	0,17

Los ensayos con mezclas binarias fueron incubados en las mismas condiciones que los de metales individuales, y también tuvieron una duración de 7 días. De la misma forma que para los individuales, al cabo de este período se determinaron diferentes parámetros de crecimiento, relación frondes colonias y biomarcadores (enzimas vinculadas al estrés oxidativo)

Tabla 7 Concentraciones nominales (mg/L) de los metales para la mezcla binaria Cd-Zn y los valores de UT correspondientes para cada una de las proporciones.

Concentración Cd	Concentración Zn	UT	
0,67	0,33		
47,87	102,31	2,67	1,33
23,93	51,15	1,33	0,67
11,97	25,58	0,67	0,33
5,98	12,79	0,33	0,17
2,99	6,39	0,17	0,08
Concentración Cd	Concentración Ni	UT	
0,5	0,5		
35,90	153,46	2,00	2,00
17,95	76,73	1,00	1,00
8,98	38,37	0,50	0,50
4,49	19,18	0,25	0,25
2,24	9,59	0,13	0,13
Concentración Cd	Concentración Ni	UT	
0,33	0,67		
23,69	205,64	1,32	2,68
11,85	102,82	0,66	1,34
5,92	51,41	0,33	0,67
2,96	25,70	0,17	0,34
1,48	12,85	0,08	0,17

Análisis de los datos para explicar la interacción tóxica de las sustancias en la mezcla binaria

El análisis de la interacción de los metales en las mezclas binarias se realizó mediante regresión múltiple, utilizando la inhibición en el número de frondes (INF) como variable dependiente y la concentración de los metales en la mezcla como variables independientes. El ajuste al modelo se comprobó a través de rectas de regresión entre observados y calculados, y prueba de significación de pendientes (Zar 2010).

El modelo utilizado corresponde a:

$$\% \text{ INF} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 (x_1 \cdot x_2) + \varepsilon$$

Donde b_0 es la constante, los valores de b representan los coeficientes de regresión y ε es el error estándar. Se estimaron los coeficientes de regresión no estandarizados β . El valor de significación considerado fue < 0.05 .

Para el análisis del comportamiento de los metales en la mezcla se utilizó el supuesto del modelo de Concentración Aditiva (CA) y Unidades tóxicas (UT) explicado con anterioridad.

5.7.2.12 Parámetros evaluados

Al finalizar los ensayos realizados con los metales en forma individual y en mezclas binarias, se evaluaron los efectos sobre diferentes parámetros:

- Crecimiento de las plantas, mediante la determinación de:
 - número de frondes
 - peso fresco y
 - caracteres morfométricos:
 - área de frondes
 - longitud del eje longitudinal de frondes
 - longitud eje transversal de frondes
- Relación frondes colonias
- Contenido en Clorofila “a”, “b” y contenido en carotenoides
- Contenido de Proteína total
- Biomarcadores, enzimas vinculadas al estrés oxidativo
 - Catalasa
 - Ascorbato Peroxidasa
 - Guayacol Peroxidasa

5.7.2.12.1 Número de frondes

Las plantas del género *Lemna* están constituidas por una estructura con aspecto de hoja denominada fronde. Estas frondes poseen una región basal donde se ubican los bolsillos laterales. El crecimiento se produce por la formación de yemas a partir de cada uno de los bolsillos o cavidades laterales. Dicho crecimiento es exponencial en condiciones óptimas de concentraciones de nutrientes en el medio. Las frondes nuevas o hijas, permanecen conectadas a la fronde progenitora por medio de una estructura denominada estípite formando grupos clonales o colonias de número variable de frondes dependiendo las condiciones de cultivo. Cuando se hace referencia a las frondes madres, implican aquellas frondes bien desarrolladas que posean una yema o fronde hija unida a ella. Mientras que una fronde hija es aquella fronde desarrollada, aunque más pequeña, que ha emergido completamente del bolsillo lateral de la fronde que la originó pero permanece unida a ella y no posee yemas o frondes hijas unidas.

En el presente trabajo, siguiendo las recomendaciones de la OECD (2006), al finalizar los ensayos se contabilizó el número de frondes, tanto madres como hijas, de cada tratado y control. Para tal fin, se retiraron las plantas de las soluciones de prueba y los controles utilizando un pincel de cerdas de Marta. Posteriormente se las colocaron en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo y se procedió a realizar el conteo de frondes madres e hijas, con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-2T) utilizando un aumento de 5X (Figura 4).

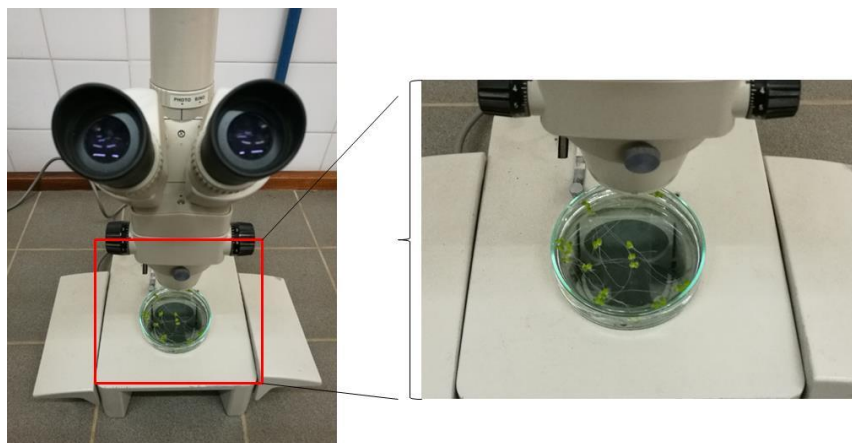


Figura 4. Plantas *Lemna gibba* colocadas en caja de Petri al finalizar un ensayo para conteo de número de frondes y colonias mediante la utilización de microscopio estereoscópico

5.7.2.12.2 Peso fresco

El peso fresco, parámetro de medición utilizado para el cálculo de las variables de respuesta presentadas en la sección anterior, se midió tanto al inicio como al termino cada ensayo. El peso fresco se determinó al comienzo de las pruebas a partir de una muestra representativa de los inóculos utilizados para iniciar las pruebas. Es decir que, para cada ensayo, de los cultivos de mantenimiento se seleccionaron las plantas para utilizar como inóculos en el comienzo de los ensayos y una muestra a la cual se le determinó el peso fresco. Los resultados se expresan en gramos.

5.7.2.12.3 Caracteres morfométricos

Al finalizar los ensayos, se determinó el área, la longitud del eje longitudinal y transversal de cada uno de las frondes individuales de las plantas control como de las tratadas. Cada uno de los caracteres se define a continuación.

Área

Área total: el área total implica la sumatoria de todos los frondes presentes en cada tratamiento o control al momento de finalizado el ensayo de toxicidad. Los resultados se expresaron como medias de tres réplicas.

Área promedio: implica dicha sumatoria dividido el número de frondes presentes en cada caso, es decir el área promedio de las frondes de cada tratamiento o control al cabo de los 7 días de exposición.

Eje longitudinal

Eje longitudinal total: como la sumatoria de los ejes longitudinales de todas las frondes de cada uno de los tratados y control al cabo de los 7 días de exposición. Los resultados se expresaron como medias de tres réplicas.

Eje longitudinal promedio: representa el eje longitudinal total de cada tratado o control dividido por el número de frondes en el momento de finalización del ensayo.

Eje transversal

Eje transversal total: como la sumatoria de los ejes transversales de todas las frondes de cada uno de los tratados y control al cabo de los 7 días de exposición. Los resultados se expresaron como medias de tres réplicas.

Eje transversal promedio: representa el eje transversal total de cada tratado o control dividido por el número de frondes en el momento de finalización del ensayo.

Tanto el área como los ejes fueron medidos mediante la utilización del software de análisis de imágenes ImageJ versión 1.48v, desarrollado por el National Institutes of Health (USA).

Captura de imágenes digitales

Al finalizar un ensayo y previo al conteo del número de frondes las plantas fueron retiradas del medio de exposición mediante la utilización de un pincel con cerdas de Marta y colocadas en un cristalizador de 7 cm de diámetro para la captura de las imágenes digitales que servirían luego para la medición del área y ejes. La cámara empleada fue una Olympus Digital modelo SP800UZ y se obtuvieron imágenes con una resolución horizontal y vertical de 72 pixeles por pulgada.

Descripción del uso del Programa

Como se mencionó previamente, la medición de los parámetros morfométricos se realizó mediante la utilización del programa ImageJ cuya ventana principal puede observarse en la figura 5. Se procedió primero a la apertura de las fotos de las plantas a medir, lo cual se realizó desde la opción desplegable del menú “File” y luego la opción “Open”. A continuación se detallan detenidamente los pasos del proceso de medición completo.

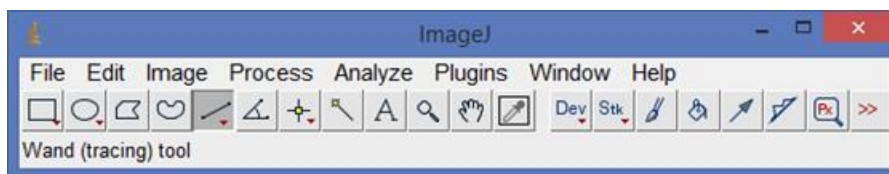


Figura 5. Ventana principal del programa ImageJ

Calibración

Una vez abierta la imagen se procedió a la calibración de la misma. Al momento de tomar las fotografías, al lado de la superficie de las plantas se colocó una regla para poder calibrar las medidas en el programa (Figura 6a). Para la calibración de las dimensiones de la foto se seleccionó primero la herramienta del menú “Straight” (Figura 6b). Esta herramienta permite marcar una línea recta en la imagen, la cual fue posicionada sobre la regla en el largo correspondiente a 10 mm (Figura 6c). Una vez marcada esta distancia en la regla se seleccionó la opción desplegable del menú “Analyze” y luego la opción “Set Scale”. En la ventana emergente se completaron las celdas de “Known distance” con el valor 10 y “Unit of length” con mm (milímetro); además se marcó la opción “Global” que permite mantener la escala en las fotos sucesivas (Figura 6d).

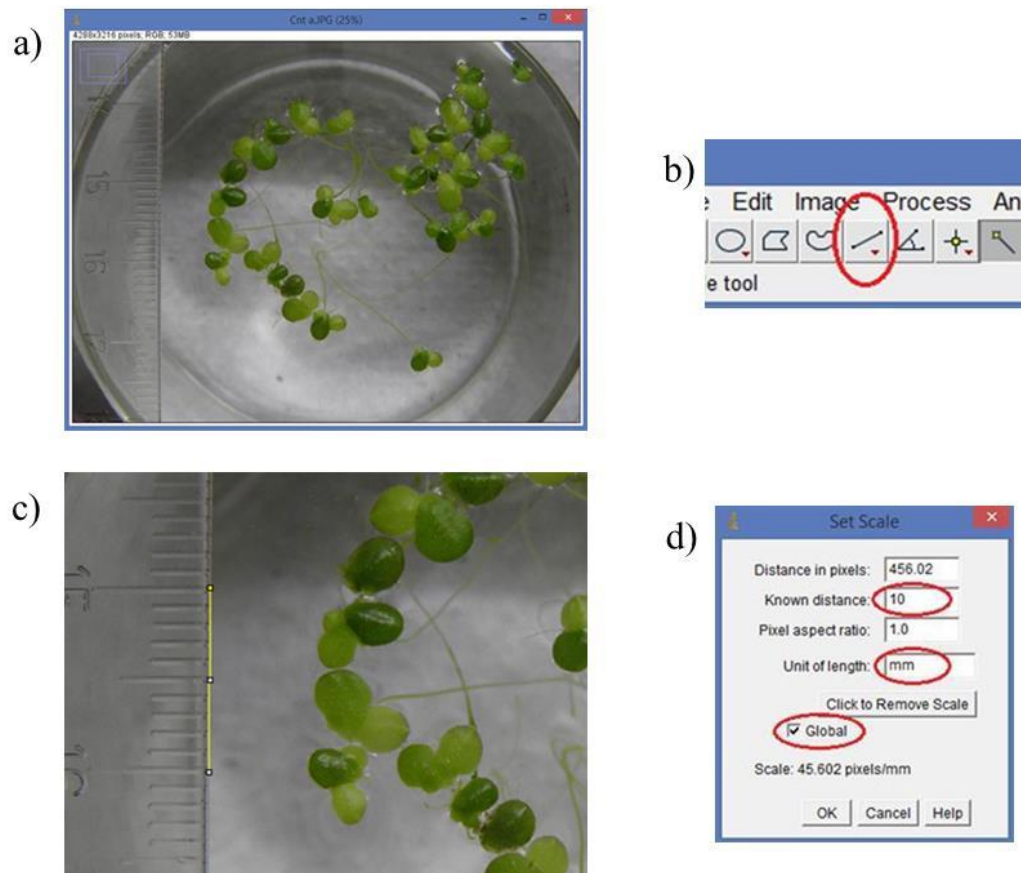


Figura 6. (a) Imagen cargada en el programa ImageJ de plantas *Lemna gibba* para medición de parámetros morfométricos. (b) Selección de la herramienta “Straight”. (c) Marcar la distancia correspondiente a 10 mm. (d) Ventana emergente para setear la escala de la imagen.

Realización de las medidas

Una vez realizada la calibración, se procedió a la medición de las áreas y ejes de las frondes de cada control y tratado. Para la selección de las áreas, se utilizó la herramienta “Polygon selections”. Con dicha herramienta se marcó el contorno de cada fronde como se muestra en la figura 7a. Una vez seleccionada el área se seleccionó la opción “Measure” dentro del menú desplegable “Analyze” y se registró de este modo el valor medido en una tabla (Figura 7d) cuyos datos fueron exportados luego a una tabla de Excel. De manera similar se procedió con la medición de ambos ejes, pero utilizando la herramienta “Straight” para colocar una línea recta sobre cada eje a medir (Figura 7b y 7c).

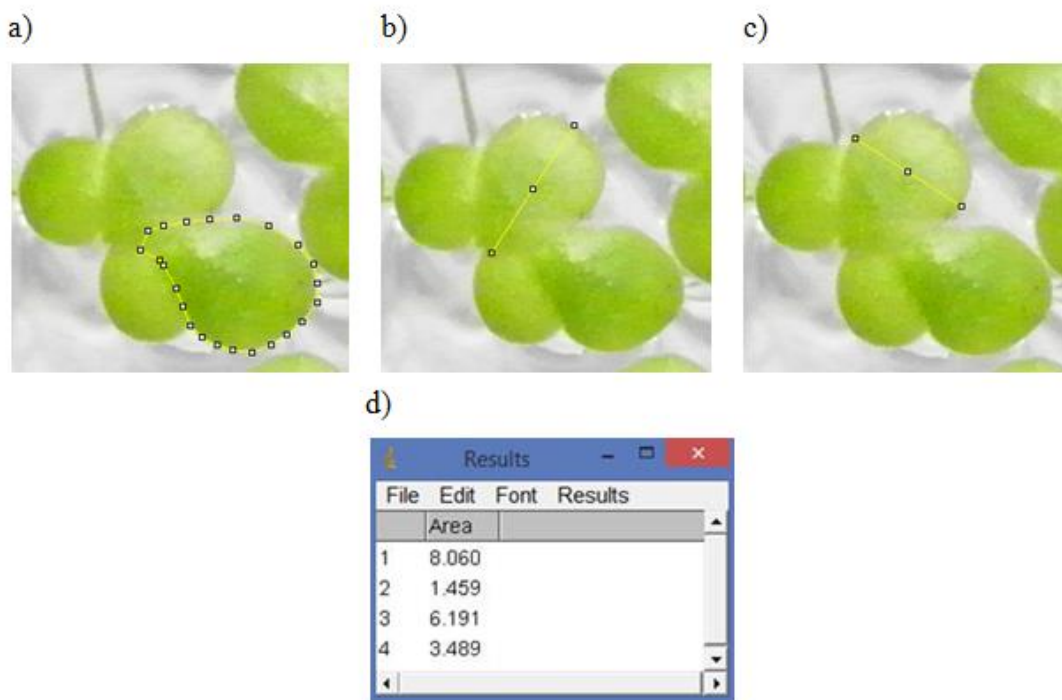


Figura 7. (a) Planta de cuatro frondes donde se seleccionó una fronde individual para determinar el área. (b) Misma planta donde se marcó el eje longitudinal a una fronde individual para la determinación de su longitud. (c) Selección del eje transversal de la misma fronde para determinación de su longitud. (d) Tabla de mediciones realizadas.

Análisis de datos

Tanto el valor total del área para cada tratado como los valores promedios de las frondes de cada uno, así como las longitudes totales de los ejes y las longitudes promedios de estos, fueron utilizadas para comparar tratados con controles e identificar anomalías en el desarrollo morfológico normal de las plantas expuestas. Las diferencias significativas fueron analizadas estadísticamente mediante el empleo de ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$).

Utilizando el número de frondes, peso fresco y área, se estimaron distintas variables de respuesta como,

- tasa de crecimiento específica (μ)
- porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento específica (% Ir)

- porcentaje de reducción en rendimiento (% Iy)
- porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (% Ihb).

A continuación se detalla cada una de ellas.

5.7.2.12.4 Tasa de crecimiento específica

La tasa de crecimiento específica para un periodo de tiempo determinado es calculada como el incremento logarítmico en una variable de medición usando la fórmula a continuación para cada control y tratamiento.

Tasa de crecimiento específica, definida como

$$\mu_{i-j} = \ln (N_j - N_i) / t$$

μ_{i-j} : tasa de crecimiento específica promedio desde tiempo i a j

donde:

N_i : variable medida en el tratado o control en tiempo i

N_j : variable medida en el tratado o control en tiempo j

t: periodo de tiempo desde i a j

A partir de este parámetro se estimó el

Porcentaje de Inhibición de tasa de crecimiento específica, definida como

$$\% Ir = (\mu C - \mu T) / \mu C \times 100$$

% Ir: porcentaje de inhibición de tasa de crecimiento específica promedio

donde:

μC : valor medio de μ en el control

μT : valor medio de μ en el tratado

5.7.2.12.5 Rendimiento

Se realizaron evaluaciones del efecto sobre el rendimiento, calculando el porcentaje de reducción del mismo, como

Porcentaje de reducción en rendimiento, definido como

$$\% I_y = (b_c - b_t) / b_c \times 100$$

% I_y : porcentaje de reducción en rendimiento

donde:

b_c: biomasa final menos biomasa inicial para el control

b_t: biomasa final menos biomasa inicial para tratado

5.7.2.12.6 Porcentaje de Inhibición respecto al control

$$\% I_{hb} = (N_c - N_t) / N_c \times 100$$

% I_{hb} : porcentaje de inhibición del tratado respecto del control

donde

N_c: variable medida en el control al finalizar el ensayo

N_t: variable medida en el tratamiento al finalizar el ensayo

5.7.2.12.7 Relación frondes/colonias

Además de los parámetros recién mencionados, con los valores de número de frondes y número de colonias al finalizar los ensayos, se calculó la relación frondes/colonias. Una colonia se define como un agregado de frondes madre e hijas (generalmente 2 a 4) que se mantienen unidas entre sí, por medio de un estípite (Figura 8), y se la individualiza como una planta. Generalmente, las frondes hijas son liberadas luego de la madurez. Esta proporción sirve como parámetro de evaluación del nivel de desagregación de las plantas.

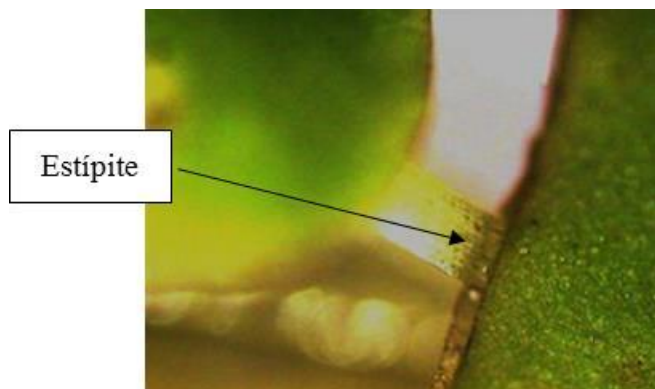


Figura 8. Estípite que mantiene unido una fronde madre con una hija

Observación del aspecto de las frondes

Al momento de realizar el conteo del número de frondes y colonias de los controles y tratados, se realizó una evaluación visual de los estados de salud de las plantas y del estado macroscópico general observado. Se prestó especial atención en la apariencia de las plantas, donde se observó y registró la pérdida de pigmentos (clorosis) y la presencia de zonas de tejido muerto dentro de la superficie de las frondes (necrosis). Estas observaciones hicieron hincapié además en la aparición de frondes con tamaño o forma anormal, en el estado de las raíces, en la desagregación o agregación anormal de frondes en colonias así como en la gibosidad característica de esta especie. En la figura 9a se muestran plantas con lesiones visibles en la superficie de las frondes y en la figura 9b se muestran frondes con clorosis.

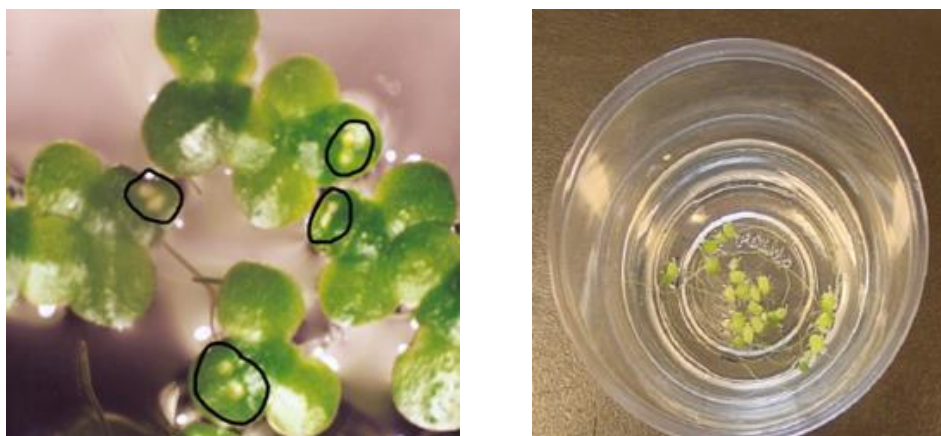


Figura 9. (a) Lesiones superficiales en plantas *Lemna gibba*. (b) Plantas con pérdida de pigmentación (clorosis)

5.7.2.12.8 Contenido en Clorofila “a”, “b” y carotenoides

Se realizó una evaluación de contenido de distintos pigmentos de las plantas controles y tratadas. Los pigmentos seleccionados fueron clorofila “a”, clorofila “b” y carotenoides totales.

El protocolo de determinación de dichos pigmentos se basó en Lichtenthaler (1987), y se detalla a continuación.

Recolección de las muestras

Inmediatamente finalizado el período de exposición de 7 días, las plantas fueron retiradas del medio de cultivo, colocadas en papel absorbente para retirar toda la humedad externa, y el peso fresco final fue medido mediante el uso de balanza analítica.

Preparación de los extractos

Comenzó luego el procedimiento de preparación de los extractos. Para cada control y tratado, la maceración de las plantas se realizó en mortero; primero se colocaron las plantas en el mortero con 1 ml de acetona 90% y se maceró por unos minutos. Se agregaron a continuación 4 ml más de acetona al 90% y se continuó con la maceración por un minuto. El homogenato obtenido fue trasvasado mediante pipeta Pasteur a un tubo Eppendorf y centrifugado durante 10 min a 10000 g. El sobrenadante producto de dicha centrifugación, denominado extracto, fue retirado a otro tubo Eppendorf y utilizado para las determinaciones.

Determinación de pigmentos

Las determinaciones fueron realizadas en espectrofotómetro UV 1800 Shimadzu a las longitudes de onda: 450, 630, 645, 663 y 750 nm. Los valores de dichas absorbancias fueron utilizados para calcular las concentraciones de las clorofilas y carotenoides, como se muestra a continuación. Los valores finales fueron expresados en mg/g de peso fresco.

Clorofila “a” = $((11.64 * (Abs_{663} - Abs_{750}) - (2.16 * (Abs_{645} - Abs_{750}))) + (0.1 * (Abs_{630} - Abs_{750}))) * (5 \text{ ml/g peso fresco})$

Clorofila "b" = $((-3.94*(Abs_{663}-Abs_{750})+(20.97*(Abs_{645}-Abs_{750}))-(3.66*(Abs_{630}-Abs_{750}))) * (5ml/g \text{ peso fresco})$

Total carotenoides = $((4.1*(Abs_{450}-Abs_{750})-(0.0435*clorofila \text{ "a"}*g \text{ peso fresco}/5ml)-(0.367*clorofila \text{ "b"}*g \text{ peso fresco}/5ml))*5ml/g \text{ peso fresco}$

5.7.2.12.9 Biomarcadores

Se realizaron determinaciones enzimáticas a partir de extractos preparados con plantas tratadas y controles inmediatamente después de finalizar los ensayos. Estas determinaciones se realizaron seleccionando concentraciones subletales de los metales estudiados tanto en forma individual como en las mezclas binarias.

Preparación de los extractos

Las plantas fueron retiradas, secadas con papel y fueron maceradas en mortero con 2 ml de buffer fosfato de sodio pH 7.4 (con 0.1% W/V Triton X-100) a 4°C. Los homogenatos resultantes fueron centrifugados por 20 min a 10000 g bajo condiciones de temperatura controlada a 4°C. El sobrenadante, extracto del cual se realizaron las mediciones, fue mantenido en hielo. Se determinó la actividad de las siguientes enzimas relacionadas al estrés antioxidante:

CAT (EC 1.11.1.6)

La actividad de la CAT (EC 1.11.1.6) fue determinada espectrofotométricamente mediante la medición del consumo de H₂O₂ a 240 nm (ϵ : 0.036 mM⁻¹cm⁻¹) en un medio de reacción con 50 mM de fosfato de sodio (pH 7), 33 mM de H₂O₂ y extracto enzimático según lo propuesto por Chance et al. (1979). Los blancos se llevaron a cabo con H₂O₂ y buffer. La actividad de la enzima fue expresada como mM de H₂O₂/mg de proteína/min.

GPOX (EC 1.11.1.7)

La actividad de la GPOX (EC 1.11.1.7) se determinó mediante la medición del incremento de la absorción a 470 nm debido a la formación de tetraguaiacol (ϵ : 26.6 mM⁻¹cm⁻¹) en un

medio de reacción con 50 mM de fosfato de sodio (pH 7), 10 mM de guaicol, 10 mM H_2O_2 , y extracto enzimático, de acuerdo con Maehly y Chance (1954). Los blancos se llevaron a cabo con H_2O_2 y buffer. La actividad de la enzima fue expresada como mM de Guaicol/mg de proteína/min.

APOX (EC 1.11.1.11)

Por su parte, la actividad de la APOX (EC 1.11.1.11) se determinó mediante la oxidación de ascorbato, siguiendo la caída de la absorbancia a 290 nm (ϵ : $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un medio de reacción conteniendo 50 mM de fosfato de sodio (pH 7), 10 mM H_2O_2 , 5 mM ascorbato y extracto enzimático de acuerdo con Nakato y Asada (1981). Los blancos se llevaron a cabo con H_2O_2 y buffer. La actividad de la enzima fue expresada como mM de H_2O_2 /mg de proteína/min.

Los resultados se expresaron también como unidad de actividad enzimática (UE) por mg de proteína. La UE se define como la actividad enzimática responsable de la conversión de 1 μmol de sustrato (o aparición de 1 μmol producto) en un minuto.

Preparación de las soluciones de buffer fosfato

Las soluciones de buffers fosfato de distintos pH utilizados para la extracción y medición de las actividades enzimáticas en las plantas fueron preparados a partir de las siguientes soluciones madres (Tabla 8).

Tabla 8. Soluciones para la preparación de buffers fosfato

Reactivos	Concentración (g/L)
KH_2PO_4 (Solución A)	9,073
Na_2HPO_4 (Solución B)	11,87

Las soluciones A y B fueron almacenadas en frascos opacos y a 4°C .

El buffer fosfato pH 7.4 se preparó colocando 19.7 mL de Solución A y 80.3 mL de Solución B. La solución de buffer fosfato pH 7 se preparó colocando 41.3 mL de Solución A y 58.7 mL de Solución B. El buffer fosfato pH 7 utilizado en la determinación de la

actividad de la GPOX se preparó colocando 41.3 mL de Solución A y 58.7 mL de Solución B con el agregado de 1 mL de guaiacol disuelto en 1 ml de glicerol.

Concentración de proteínas

La determinación de proteínas totales se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). Para ello, se tomaron 100 µL del extracto (correspondiente a control o tratamiento) y se colocaron en un tubo de ensayo al cual se le agregó 1 ml del reactivo de Bradford. Luego se utilizó un agitador vórtex para lograr una correcta mezcla en el tubo, se dejó actuar por al menos dos minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro antes de una hora. Los resultados se expresaron como mg/ml de extracto.

Para la preparación del reactivo de Bradford se utilizaron los siguientes reactivos:

-100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50mL de etanol al 95%.

-100 mL de ácido fosfórico al 85% (w/v).

La solución resultante se diluyó a un volumen final de 1litro con agua ultrapura calidad Milli-Q. Las concentraciones finales en el reactivo fueron 0.01% (w/v) del colorante, 4.7% (w/v) de etanol y 8.5% (w/v) de ácido fosfórico. Se realizó una curva patrón de calibración de proteínas totales utilizando albúmina bovina. Para ello, se preparó una solución madre con una concentración de 1 mg albúmina/1 ml a partir de la cual se prepararon diluciones en buffer fosfato pH 7,4 con 0,1% de tritón a concentraciones finales de 0.012 - 0.025 - 0.05 - 0.1 - 0.2 - 0.4 y 0.8 mg/ml. Se tomaron 100 µl de cada una de esas diluciones y se les agregó 1 ml del reactivo de Bradford; se dejó actuar por al menos 2 minutos y antes de 1 hora se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm.

Las determinaciones de todas las enzimas y proteínas se llevaron a cabo en espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV 1800.

5.7.2.4 Diseño experimental de las evaluaciones de mezclas trinarias de los metales estudiados

Se evaluaron los efectos tóxicos de la mezcla trinaria de los metales Zn, Ni y Cd sobre el crecimiento y bioacumulación en plantas *Lemna gibba*. Para ello, se implementó un diseño compuesto central (CCD, por su sigla en Inglés) para la selección de las concentraciones de cada metal en la mezcla. El CCD, es un diseño experimental factorial incompleto que

permite el incremento del número de réplicas y del rango de las concentraciones experimentales. Esto es ventajoso comparado con un diseño experimental factorial de tres factores completo, lo implicaría el uso mucho más intensivo de recursos. Se realizaron dos ensayos diferentes con diferentes concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) en el medio de cultivo, con el fin de evaluar su influencia en la toxicidad ya que es sabido que éste puede actuar como ligando natural de metales en ambientes acuáticos. Las concentraciones de COD utilizadas fueron 0.5 y 10 mg/L. Entre 5 y 10 mg COD/L es un rango de concentración común de encontrar en agua naturales, mientras que una de 0.5 mg COD/L es considerada baja, la cual sería un control ya que dicha cantidad de COD suele ser utilizada en el medio de cultivo como un buffer de reemplazo del EDTA para mantener la disponibilidad de nutrientes particularmente el Fe (Gopalapillai et al. 2012). Ambos ensayos de mezcla trinaria, quedaron compuestos finalmente por controles más 20 casos de combinaciones diferentes de los tres metales. En el caso del ensayo con 0.5 mg COD/L, los rangos de concentración para Ni, Cd y Zn en estos tratados resultaron ser de 14 a 439 $\mu\text{g L}^{-1}$, de 0 a 547 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 9.9 a 128 $\mu\text{g L}^{-1}$ respetivamente. En el caso del ensayo con 10 mg COD/L, los rangos de concentración para Ni, Cd y Zn en estos tratados resultaron ser de 15.7 a 468 $\mu\text{g L}^{-1}$, de 0 a 689 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 22.4 a 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ respetivamente. Todas estas concentraciones representan valores determinados analíticamente y no nominales. Los mismos fueron medidos usando Espectroscopia de absorción atómica en llama o Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplada inductivamente; protocolo explicado más adelante.

Las pruebas con mezcla trinaria tuvieron una duración de 7 días, fueron llevadas a cabo bajo las mismas condiciones experimentales que las pruebas con metales individuales y binarias, y empleando el mismo medio de cultivo. Los diferentes tratamientos fueron realizados por duplicado, mientras que para el control se realizaron 6 réplicas.

5.7.2.4.1 Parámetros evaluados

Al cabo de la finalización de las experiencias realizadas a fin de evaluar la acción de mezclas trinarias sobre *L. gibba*, se determinaron parámetros que permitieron conocer la acción de las mezclas sobre el crecimiento. Estos parámetros fueron el número de frondes y la longitud de las raíces de las plantas expuestas y controles.

5.7.2.4.1.1 Número de frondes

Se realizó el conteo del número de frondes madres e hijas, de acuerdo a los criterios mencionados en el apartado 5.7.2.12.1.

El procedimiento utilizado para retirar y observar las frondes, así como los materiales y equipo óptico utilizados son los detallados en el apartado mencionado.

5.7.2.4.1.2. Longitud de las raíces

La determinación de la longitud de las raíces de las plantas expuestas y controles se realizó mediante el uso de una regla, colocando las plantas estiradas sobre una superficie lisa, de manera de medir desde la superficie inferior de las frondes, donde nacen las raíces, hasta su extremo más distal (Figura 10). Las mediciones de las raíces se realizaron en 4 ejemplares elegidos al azar, representativas del conjunto de plantas para cada réplica.



Figura 10. Medición de la longitud de las raíces en *Lemna gibba*

Con el objetivo de evaluar el efecto de las mezclas sobre las plantas de la especie *Lemna gibba*, los parámetros de número de frondes y longitud de raíces fueron utilizados para calcular el porcentaje de inhibición respecto al control.

Porcentaje de Inhibición respecto al control:

$$\% \text{ Ihb} = (N_c - N_t) / N_c \times 100$$

% Ihb : porcentaje de inhibición del tratado respecto del control

donde

N_c : variable medida en el control al finalizar el ensayo

N_t : variable medida en el tratamiento al finalizar el ensayo

Cuando el porcentaje de Inhibición respecto al control fue estimado utilizando el número de frondes, la notación se indicó como %INF.

Cuando el porcentaje de Inhibición respecto al control fue estimado utilizando la longitud de las raíces, la notación se indicó como %ICR.

5.7.2.4.2 Determinación de dosis externa y dosis interna

Al igual que para el análisis de mezclas binarias, el modelo aceptado *a priori* es el de la Concentración Aditiva (CA), implicando que los componentes de la mezcla no interaccionan entre si en el uptake en el organismo ni se influyen en la farmacocinética o en el efecto fisiológico en un organismo. En CA se asume que cada químico de la mezcla contribuye a la toxicidad a través de un sitio de acción en común, y por lo tanto un mismo efecto puede ser producido reemplazando un químico por otro con una cantidad tóxica equivalente de un químico diferente (Balistreri et al. 2014). Una limitación de este modelo de aditividad es que no considera la interacción entre los componentes de la mezcla como la competencia por ligandos orgánicos e inorgánicos en solución o en el uptake de los organismos. Se ha demostrado para *Lemna minor* que la predicción de la toxicidad de la mezcla trinaria Ni-Cu-Cd fue más precisa, es decir más cercana a la aditividad, cuando la dosis estuvo basada en la concentración interna que para la concentración externa soluble (Gopalapillai y Hale 2017). Dicho modelo fue elegido por ser probablemente más relevante en mezclas de metales que otro de adición, como lo es el modelo Acción Independiente, ya que muchos elementos traza catiónicos tienen mecanismos de toxicidad similares

(Gopalapillai y Hale 2015). Además es el más conservativo en la mayoría de los casos y es propuesto a menudo en evaluación de riesgo (Cedergreen et al. 2012).

En el presente trabajo, se determinaron las concentraciones de metales en solución al inicio del ensayo de mezclas trinarias y la concentración de metales en los tejidos vegetales al finalizar el mismo. Esto se realizó con el fin de evaluar si CA de concentración interna resulta en un mejor predictor, de la toxicidad de la mezcla Cd-Ni-Zn en la planta acuática *Lemna gibba*, que la comúnmente utilizada concentración disuelta.

Se utilizará la notación $[M_{sol}]$ para referirnos a las concentraciones solubles de los metales al comienzo del ensayo; y $[M_{int}]$ para referirnos al contenido de metales en las plantas al finalizar los ensayos.

Determinación de concentraciones solubles iniciales de metales ($[M_{sol}]$)

Para la medición de la concentración inicial disuelta, se tomó una muestra de 10 ml del medio de cultivo control y de los distintos tratamientos con metales, antes del comienzo del ensayo. Estas se filtraron a través de discos de membrana de nitrocelulosa MicronSep® 25 mm 0.45µm (Life science GVS®) y transferidos a tubos de polipropileno de 15-ml. Luego de esto se adicionó a la solución un 0.2% de HNO_3 ultrapuro para la preservación y se guardaron a 4°C hasta su análisis. La medición analítica fue realizada mediante Espectroscopia de absorción atómica en llama, con corrección de fondo por efecto Zeeman (Varian Spectra AA 220) o Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) (Vista RL; Varian) con nebulizador ultrasónico para incrementar el límite de detección. Los límites de detección fueron de 0.05 y 0.002 mg/L respectivamente (Gopalapillai y Hale 2017).

Digestión de las plantas

Se procedió siguiendo lo desarrollado por Gopalapillai y Hale (2017). Luego de finalizado el ensayo de mezclas trinarias y los parámetros medidos, las plantas de cada replica se juntaron y se sumergieron en medio de cultivo 20X AAP nuevo y sin agregado de metales, luego de esto se sumergieron por 2 minutos en solución de EDTA 0.01 M y vueltos a colocar en el medio nuevo. Este procedimiento removió el metal adsorbido en la superficie de las plantas para determinar exclusivamente el contenido interno $[M_{int}]$. Las plantas

fueron luego secadas gentilmente con papel absorbente y transferidas a canastitas de aluminio, las cuales fueron colocadas en horno a 60°C durante toda la noche. Las plantas secas, fueron pesadas con balanza analítica y transferidas a recipientes de Teflón de 60-ml. Se agregó a cada recipiente HNO₃ concentrado y se mezcló bien con las plantas quedando estas totalmente sumergidas en el ácido. Los recipientes con las plantas fueron cerrados con tapas a rosca y colocados en horno a 105°C dentro de una campana de humos para digerir toda la noche. Luego de esto, las muestras se transfirieron a tubos de polipropileno de 15-ml usando embudo con papel de filtro Whatman ® grado 42 (tamaño de partículas retenidas >2.5 µm) (Whatman Inc., NJ, USA), y se llevó a volumen final de 10 ml con agua ultrapura y se guardó a 4°C hasta su determinación. Se digestaron también los blancos apropiados y material estándar de referencia (NIST 1570a, Trace Elements in Spinach, U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD). Durante las mediciones, entre cada corrida de 10 muestras se midió un blanco y un control de concentraciones conocidas de los metales Cd, Ni y Zn. Si la desviación estándar de la absorbancia era mayor al 10%, el instrumento era recalibrado y las diez muestras medidas, analizadas nuevamente.

Determinación de la concentración de metales en tejidos vegetales ([M_{int}])

Luego de la digestión de las plantas, se procedió a la determinación de la concentración de metales en los tejidos vegetales. La concentración de metales en tejidos vegetales fue medida mediante el uso de Espectroscopia de absorción atómica en llama, con corrección de fondo por efecto Zeeman (Varian Spectra AA 220) o Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) (Vista RL; Varian) con nebulizador ultrasónico para incrementar el límite de detección. Los límites de detección fueron de 0.05 y 0.002 mg/L respectivamente.

5.7.2.4.3 Análisis de los datos para explicar la interacción tóxica de las sustancias en la mezcla trinaría

En este estudio se examinaron y cuantificaron las desviaciones con respecto al modelo de referencia utilizado (Concentración de adición) considerando la dosis como las concentraciones solubles de los metales al comienzo del ensayo ([M_{sol}]) o como el

contenido interno de metales en las plantas ($[M_{int}]$). Con el fin de analizar las interacciones entre los metales (tanto para $[M_{sol}]$ como para $[M_{int}]$) se llevaron a cabo regresiones donde se calcularon los distintos coeficientes para cada interacción. Cada una de estas regresiones, es decir cuando se tuvo en cuenta la dosis como $[M_{sol}]$ y cuando se tuvo en cuenta como $[M_{int}]$, fueron realizadas ajustando las concentraciones de los metales con los efectos observados en las plantas %INF o %ICR.

El modelo completo de las regresiones fue:

$$\% \text{ INF ó ICR} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_4 (x_1 \cdot x_2) + b_5 (x_1 \cdot x_3) + b_6 (x_2 \cdot x_3) + b_7 (x_1 \cdot x_2 \cdot x_3) + \varepsilon$$

Donde los b representan los coeficientes de regresión y ε es el error normal. El modelo fue reducido a su forma más parsimoniosa mediante la eliminación de los términos no significativos mediante regresión “stepwise” ($p > 0.15$) utilizando el software SigmaPlot. Con el fin de evaluar si el enfoque de adición de concentración (CA) es un modelo correcto para evaluar la toxicidad de la mezcla de estos tres metales en la especie *Lemna gibba*, se calculó la concentración esperada (como $[M_{sol}]$ ó $[M_{int}]$) de los tres metales en la mezcla que resultaría en una inhibición de 50% (para %INF ó %ICR), resolviendo las ecuaciones de regresión para [Cd] mientras se mantuvieron los valores de las concentraciones de Ni y Zn que estaban presentes en las mezclas. Una vez obtenidas estas combinaciones de los metales, fueron usadas para calcular la “suma de las unidades toxicas” ($\sum TU$) para cada uno de los 20 casos, como se muestra a continuación (Gopalapillai and Hale 2015):

$$\sum TU = \sum_{i=1}^n \frac{Ci}{EC50i}$$

Donde Ci denota la concentración del tóxico i en la mezcla causando el 50% de inhibición del crecimiento y $EC50i$ es la concentración del tóxico i causando el 50% de inhibición del crecimiento en una exposición de metal individual. Cuando $\sum TU = 1$, ocurre CA; pueden ocurrir desviaciones de la unidad, como cuando la suma es más que 1 (indicando que el

efecto de la mezcla es menos que aditiva) o cuando la suma es menos que 1 (indicando que el efecto es más que aditivo).

5.8 Experiencias realizadas con *Ceratophyllum demersum*

5.8.1 Condiciones de mantenimiento de los cultivos stocks

Los cultivos stock de plantas se mantuvieron en peceras de aproximadamente 10 L con medio de cultivo esterilizado por autoclave. El medio de cultivo fue el Andrew's modificado detallado en las secciones previas. Las plantas se mantuvieron bajo las mismas condiciones que las detalladas en la sección 5.6; es decir a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo luz blanco frío en un rango de intensidad entre $100\text{-}150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para una radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm); con un fotoperiodo de 16:8 h luz-oscuridad. El medio de cultivo de cada pecera fue renovado completamente cada aproximadamente 10 a 15 días por medio de cultivo nuevo, momento en el cual se realizaba una limpieza profunda de las peceras. La cantidad de biomasa en cada pecera fue controlado periódicamente permitiendo a las plantas crecer con espacio y que todas tengan acceso a la cantidad de luz adecuada. Para esto se fueron retirando las plantas más antiguas, y dejando las más jóvenes con aspecto saludable y meristema apical de crecimiento observable.

5.8.2 Evaluaciones ecotoxicológicas de metales individuales

5.8.2.1 Protocolo utilizado en los ensayos de ecotoxicidad

Se realizaron ensayos de ecotoxicidad exponiendo plantas de *C. demersum* a diferentes concentraciones de los metales Zn, Ni y Cd durante un período de 14 días, a fin de cuantificar los efectos en el crecimiento vegetativo y en la fisiología de esta especie, de acuerdo a las recomendaciones descriptas en el protocolo OECD 2014. La evaluación de los efectos se realizó mediante la determinación de diferentes variables, a saber: peso fresco, longitud del vástago principal y longitud total (la cual incluyó la longitud de las ramas laterales además de la del vástago principal). Además se evaluó el efecto sobre distintos parámetros bioquímicos, a saber: contenido de proteínas y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa.

5.7.2.1 Organismo de prueba utilizado

Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento y de bioacumulación con la especie *Ceratophyllum demersum* mediante la exposición de esta especie a distintas concentraciones de los metales Zinc, Níquel y Cadmio. Esta especie pertenece a la División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Ceratophyllales, Familia Ceratophyllaceae. Se la conoce popularmente como cola de zorro entre otros nombres.

5.8.2.1.1 Cultivos

Los cultivos con crecimiento activo se mantuvieron según lo descrito en la sección 5.6 en una habitación climatizada. Sin embargo, con el fin de reducir la frecuencia del mantenimiento, durante los periodos de tiempo en los cuales no se realizaron ensayos, los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones reducidas de iluminación y temperatura ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $20 \pm 2^\circ\text{C}$). En estos casos, al menos 20 días antes del comienzo de un ensayo, una cantidad suficientes de plantas fueron transferidas asépticamente a medio de cultivo nuevo esterilizado y cultivadas bajo las mismas condiciones que en los ensayos (OECD 2014).

Ensayos de sensibilidad

Previamente a la realización de las evaluaciones se realizaron ensayos de referencia mediante la exposición a 3,5-diclorofenol. Esta prueba de sensibilidad permitió validar la respuesta obtenida en los bioensayos asegurando la calidad de los resultados y la precisión de los análisis generados a partir de los mismos. Para realizar estos ensayos se preparó medio de cultivo (modified Andrews' medium) con concentraciones de 1.12 - 2.5 - 5 - 10 y 20 mg $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O/L}$. Los controles consistieron en exposiciones en el mismo medio de cultivo sin el agregado del tóxico de referencia. Los ensayos fueron realizados por triplicado en los mismos tubos de vidrio con 50 ml de medio de cultivo tratado o control.

5.8.2.1.2 Medio nutritivo

El medio de cultivo empleado en los ensayos de toxicidad realizados con *C. demersum* fue el Medio Andrews Modificado, utilizado también para el mantenimiento de esta especie en

condiciones de laboratorio. Su composición, preparación y características corresponden a lo mencionado en la sección 5.6 (OECD 2014).

5.8.2.1.3 Selección de los ejemplares

Los ejemplares seleccionados para su utilización como inóculos de los ensayos fueron de tamaño uniforme, correspondiendo a plantas jóvenes en activo crecimiento y sin la presencia de lesiones visibles o decoloración (OECD 2014).

5.8.2.1.4 Aclimatación a las condiciones de ensayo

Una semana previa al inicio de los ensayos, las plantas seleccionadas para dichas evaluaciones fueron colocadas en medio de cultivo nuevo en tubos de vidrio idénticos a los utilizados para la realización de las exposiciones. Los tubos utilizados correspondieron a tubos de vidrio fino diseñados especialmente siguiendo las recomendaciones de la norma por lo que presentaron 25 cm de longitud y 2 cm de diámetro, de manera de asegurar que las plantas no tomen contacto con las paredes del tubo al finalizar los ensayos.

5.8.2.1.4 Preparación de las soluciones de prueba

Las soluciones de exposición, fueron preparadas desde una solución madre concentrada de cada uno de los tres metales. Las soluciones madre se lograron mediante la dilución de los siguientes reactivos en agua bidestilada. El reactivo utilizado para los ensayos con Zn fue el ZnCl_2 (cloruro de zinc); para los de Ni fue el $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de níquel (II) hexahidratado), ambos estos de la marca Biopack®. Mientras que se utilizó $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (cloruro de cadmio monohidratado) de la marca Anedra® para preparación de la solución madre de los ensayos con Cd. Las concentraciones de las soluciones madre fueron: 125 mg Cd/100 ml – 80 mg Ni/100 ml y 2000 mg Zn/100 ml.

Las concentraciones de exposición del Zn fueron: 3.67 - 7.33 - 14.67 - 29.34 y 58.68 mg/L; mientras que las de Ni fueron: 0.85 - 1.71 - 3.42 - 6.84 y 13.69 mg/L; y las concentraciones de exposición de Cd fueron: 0.12 - 0.25 - 0.5 - 1 y 2 mg/L.

5.8.2.1.5 Exposición

Las exposiciones se iniciaron con plantas jóvenes de 2.5 cm de longitud, sin presencia de ramas laterales, con presencia de meristema apical y sin marcas de deterioro ni pérdida de pigmentación verde (OECD 2014). Se colocó una planta por cada tubo control y tratado; se trabajó con cuatro replicas por tratamiento (OECD 2014).

Los tubos se colocaron en dispositivos de acrílico transparentes que constan de un diseño realizado específicamente para estos estudios, ya que permiten que las plantas reciban la luz de forma frontal sin ninguna interferencia, teniendo en cuenta el volumen final de las soluciones de prueba (Figura 11).

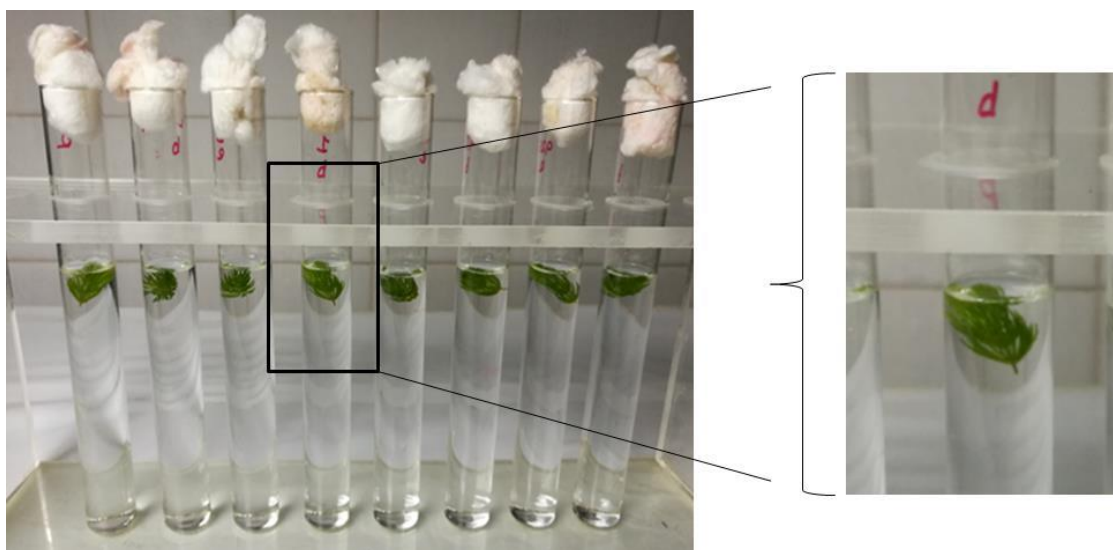


Figura 11. Tubos con plantas *Ceratophyllum demersum* colocadas en dispositivo de acrílico en mesada de exposición (izquierda). Detalle donde se aprecia que el límite de la solución donde están las plantas queda por debajo del borde superior de la gradilla de manera que no interfiere con la luz (derecha).

Aunque la luz y la temperatura fueron homogéneas en toda la superficie donde se llevaron a cabo las experiencias, se implementó un diseño aleatorio para la ubicación de los recipientes control y tratados al momento de la incubación para minimizar la influencia de las diferencias espaciales en intensidad lumínica y temperatura. Además, se llevó a cabo un reordenamiento periódico también aleatorio.

5.8.2.1.6 Inicio de los ensayos

Los ensayos se dieron por iniciado cuando las plantas de 2.5 cm de longitud se colocaron en los tubos de vidrio previamente descritos, con 50 ml de medio de cultivo solo (control) o con el agregado de distintas concentraciones de los metales (tratados). En la parte superior de los tubos se colocó un tapón de algodón para evitar la contaminación pero permitir el paso del aire. Las plantas fueron expuestas a concentraciones crecientes de metales individuales. En la figura 12 se pueden observar las plantas dentro de los tubos durante el transcurso de un ensayo de toxicidad.



Figura 12. *Ceratophyllum demersum* en condiciones de exposición en ensayo de toxicidad

5.8.2.1.8 Duración

Los ensayos de exposición de las plantas *Ceratophyllum demersum* a los metales Zn, Ni y Cd con el objeto de evaluar el crecimiento y los parámetros bioquímicos previamente mencionados tuvieron una duración de 14 días.

Al finalizar los ensayos se determinaron parámetros de crecimiento, contenido total de proteínas y actividad enzimática de la catalasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa.

5.8.2.2 Parámetros evaluados

Al finalizar los ensayos se evaluaron los efectos sobre diferentes parámetros:

- Crecimiento de las plantas, mediante la determinación de:
 - longitud tallo principal
 - longitud total
 - peso fresco

- Biomarcadores, enzimas vinculadas al estrés oxidativo:
 - Catalasas
 - Ascorbato Peroxidasa
 - Guayacol Peroxidasa

Longitud tallo principal/longitud total

Se determinó la longitud del tallo principal de las plantas controles y tratadas mediante la utilización de una regla. La extracción de las plantas se realizó inmediatamente después de terminado el ensayo. En caso de presentar crecimiento de ramas laterales, estas también se midieron con regla; la sumatoria de la longitud del tallo principal y la de las ramas laterales fue lo que denominó como longitud total.

Recolección de las muestras

Las plantas fueron retiradas de los tubos al finalizar los ensayos suavemente mediante la utilización de una pinza de acero inoxidable.

Medición de las longitudes

Al ser retiradas de los tubos, las plantas fueron escurridas en papel absorbente de manera de retirar el exceso de agua adherida a la superficie y se colocó sobre una superficie blanca y con la utilización de una regla se midieron las longitudes.

En la figura 13 se muestra un ejemplo de cómo se procedió a la medición de las longitudes de los vástagos.

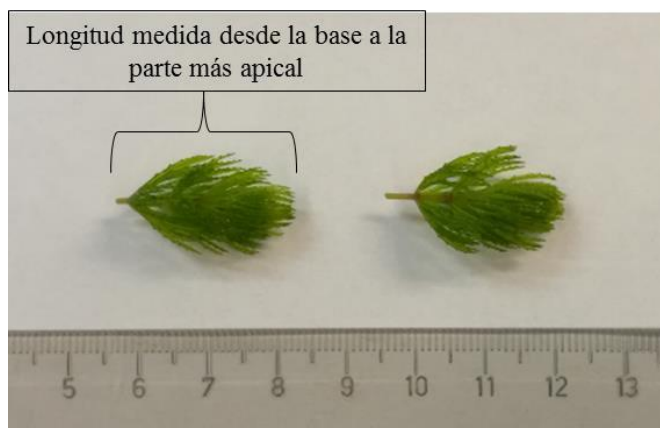


Figura 13. Medición de la longitud del vástago de planta de *Ceratophyllum demersum*

5.8.2.2.2 Peso fresco

Al comienzo de cada ensayo, se registró el peso fresco de las plantas de 2.5 cm antes de ser colocadas en las soluciones de exposición. Para esto, antes de ser pesadas, fueron secadas suavemente utilizando papel absorbente durante 10 segundos (valor de peso fresco inicial). Luego de los 14 días de duración de los ensayos, las plantas fueron retiradas de los tubos de exposición, secadas suavemente con papel absorbente y su peso fresco fue registrado (valor de peso fresco final).

Cada uno de estos parámetros fue utilizado para el cálculo de distintas variables de respuesta:

- tasa de crecimiento específica (μ)
- porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento específica (% Ir)
- porcentaje de reducción en rendimiento (% Iy)
- porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (% Ihb).

El detalle de los cálculos de cada variable corresponde a lo mencionado en la sección 5.7.2.3.1

5.8.2.2.3 Biomarcadores

Al finalizar los ensayos, se llevó a cabo una evaluación de distintos parámetros bioquímicos. Se determinó el contenido de proteínas totales y la actividad de las enzimas con actividad antioxidante catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APOX) y de la guaiacol peroxidasa (GPOX), en concentraciones subletales de los metales estudiados. Al igual que lo desarrollado para el caso de la especie *Lemna gibba*, los extractos fueron preparados a partir de las plantas (control y tratadas) inmediatamente finalizado los ensayos. Estas fueron maceradas en mortero con 2 ml de buffer fosfato de sodio pH 7.4 (con 0.1% W/V Triton X-100) a 4°C. Tanto el preparado de los extractos como las determinaciones fueron llevadas a cabo de la misma forma que lo detallado en la sección 5.7.2.3.5. La determinación de proteínas totales también se llevó a cabo por el método de Bradford (1976) explicado en esa misma sección.

5.8.2.3. Validez de los ensayos

Se cumplieron las condiciones de validez de los ensayos según lo propuesto en el protocolo OECD (2014), es decir el tiempo de duplicación de la longitud del tallo principal fue menor

a los 14 días en el control, el coeficiente de variación del rendimiento basado en las distintas variables de respuesta en los controles no excedió el 35% entre réplicas y más del 50% de las réplicas de los controles permanecieron libres de contaminación. El tiempo de duplicación de la longitud del tallo principal fue menor a 14 días en los controles. Por otra parte, el coeficiente de variación para el rendimiento calculado en base a las variables de medición utilizadas en los controles no excedió el 35% entre las réplicas. Además, más del 50% de las réplicas del control se mantuvieron estériles sin la aparición de contaminación visible por parte de otros organismos durante el periodo completo de duración de los ensayos.

Resumen de las condiciones de realización de los ensayos de ecotoxicidad:

Tabla 9. Condiciones de los ensayos con *Ceratophyllum demersum*

Tipo de ensayo: Estático

Temperatura: 23 ± 2

Calidad de luz: blanca fría

Intensidad de luz: 6000 a 9000 Lux

Fotoperiodo: 16:8 hs luz:oscuridad

Inóculo inicial: 1 planta de 2.5 cm

Medio de cultivo: modified Andrews' medium

Número de réplicas: 4

Duración del ensayo: 14 días

Efecto medido: crecimiento y parámetros bioquímicos

5.7.2.4 Estimación de índices de toxicidad

Se estimaron índices de toxicidad como la concentración efectiva 50 (CE50), CENO y CMEO. Las definiciones de cada uno fueron indicadas en la sección 5.7.2.8 correspondiente a la descripción de los ensayos con *Lemna gibba*.

El protocolo OECD (2014) recomienda que estos índices se estimen preferentemente en base a la longitud del eje principal, longitud total o peso fresco. En el presente trabajo, se calcularon los índices CE50, CENO Y CMEO en base al peso fresco a los 14 días de exposición, y se incluyeron los valores de CENO y CMEO para longitud total y longitud de tallo principal en los casos que fue posible determinarlos.

5.8.3 Evaluación de bioacumulación de metales

Con el objetivo de comprender la toxicocinética de bioacumulación de la especie *Ceratophyllum demersum* expuesta a los metales evaluados en esta tesis, se llevaron a cabo exposiciones a concentraciones fijas de los tres metales individuales teniendo en cuenta las recomendaciones de US EPA (2003), US EPA (2004b) y Connel et al. (1990). Se tomaron muestras del medio y de las plantas regularmente, de manera de hallar el punto donde las tasas de incorporación del metal se mantenían constante en función del tiempo. Dicho punto representa el punto en estado estable aparente donde la concentración de los metales en los tejidos vegetales permanece constante mientras la exposición es continua. Se determinaron los Factores de Bioconcentración (FBC), que se define como la relación entre la concentración de un metal en particular en un organismo y la concentración del mismo en el medio circundante en un estado estable (EPA 2003), calculado como:

$$\text{FBC} = \text{concentración en tejido} / \text{concentración en medio}$$

La relación encontrada entre la incorporación de cada metal en el tejido vegetal en función del tiempo se ajustó al modelo de cinética de saturación de Michaelis-Menten que tiene como expresión:

$$\text{CM} = (\text{Conc max} * T) / (k_a + T)$$

Donde,

CM: concentración del metal en la planta

Conc máx: concentración máxima acumulada del metal en el tejido vegetal. Capacidad de bioconcentración de la planta

ka: tiempo al cual se registra la mitad de la concentración máxima. Constante de afinidad en el equilibrio entre la planta y la solución externa.

T: tiempo

Se comprobó el ajuste de los resultados al modelo mencionado mediante la estimación del coeficiente de determinación R^2 .

5.8.3.1 Diseño experimental

Las experiencias de bioacumulación se llevaron a cabo utilizando el mismo medio de cultivo y las plantas fueron incubadas bajo las mismas condiciones que las detalladas para las evaluaciones ecotoxicológicas. Las plantas utilizadas para estos ensayos fueron seleccionadas de los cultivos stock y mantenidas en tubos de vidrio de 25 cm de longitud con un diámetro interno de 2 cm y tapa de algodón con medio de cultivo nuevo y esterilizado por al menos una semana para aclimatar las mismas a los recipientes donde las pruebas fueron realizadas. Para dar comienzo a los ensayos, las plantas sin presencia de ramas laterales fueron cortadas a 15 cm de longitud, su peso fue registrado, y fueron colocadas en los tubos con 70 ml de medio de cultivo con la presencia de cada uno de los metales.

5.8.3.1.1 Selección de las concentraciones de metales

Las experiencias fueron realizadas para una concentración de cada uno de los metales. Dicha concentración fue basada en las experiencias donde se evaluó el efecto ecotoxicológico, y se eligieron aquellas donde las plantas no presentaron un daño visual aparente, pero fundamentalmente, utilizando la tasa de crecimiento de los tratados y controles como criterio de selección. La concentración de exposición fue seleccionada

como aquella a la cual se observó una inhibición de la tasa de crecimiento menor al 30% respecto al control. Para el caso de Cd, la concentración seleccionada (nominal) para los ensayos de bioacumulación fue 0.5 mg/L; para Zn fue 8 mg/L; mientras que para Ni fue 6 mg/L. En cada ensayo, se realizaron también controles, los cuales consistieron de plantas en medio de cultivo sin la presencia de metales a las que se les determinó el contenido de metal al finalizar las experiencias. También en estos casos se realizó una renovación diaria del medio de cultivo. Se trabajó en todos los casos con duplicados. En la figura 14 se muestran plantas expuestas dentro de los tubos de vidrio durante un ensayo de bioacumulación.



Figura 14. *Ceratophyllum demersum* en condiciones de exposición en ensayo de bioacumulación

5.8.3.1.2 Preparación de las soluciones

Las soluciones de exposición, fueron preparadas desde una solución madre concentrada de cada uno de los tres metales. Los reactivos empelados fueron los mismos que para los ensayos ecotoxicológicos, es decir, ZnCl_2 (cloruro de zinc), $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de níquel (II) hexahidratado) y $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (cloruro de cadmio monohidratado).

Para cada ensayo, el medio de cultivo fue renovado cada 24 hs con el fin de mantener una concentración externa constante a lo largo de todo el periodo de duración.

5.8.3.1.3 Protocolo de extracción de las plantas

Se retiraron plantas a la hora 1, 2, 4 y 8 así como al día 1, 2, 4, 7, 9, 11, 14 y 18 para detección de metales en tejidos (Figura 15). Al momento de retirarse la planta, se enjuago en medio de cultivo nuevo sin metales, se sumergieron en solución de EDTA 0.01 M y vueltas a colocar en el medio de cultivo nuevo. Luego de esto, las plantas fueron secadas suavemente con papel absorbente por 10 segundos y su peso fresco fue registrado.

5.8.3.1.4 Secado de las plantas

Luego de registrado el peso fresco, las plantas fueron colocadas en canastitas de aluminio y puestas en estufa de vacío a 110°C y 50 cmHg por dos horas para registrar luego el peso seco.

5.8.3.2 Digestión de las plantas

Con el fin de analizar el contenido de metal en las plantas, se realizaron digestiones del material vegetal seco luego de ser retirado de la estufa de vacío. Éstas se llevaron a cabo en un digestor por microondas marca “Anton Paar” modelo “Multiwave 3000”. Cada muestra vegetal, una vez registrado el peso seco, se colocó en tubos de teflón con 5 ml de HNO₃ concentrado de pureza analítica. Estos tubos se cerraron con una tapa de teflón a presión; los mismos fueron colocados en el rotor del microondas. El programa de digestión consistió en una rampa inicial de 10 minutos hasta llegar a 800 W de potencia, seguido de una meseta a esta misma energía durante 10 minutos. Una vez enfriados los tubos, se trasvasó el contenido a viales de vidrio y se guardó a 4°C hasta su determinación (Método #3052; US EPA 1996a).

5.8.3.3 Determinación analítica del contenido de metales

Las muestras de tejido vegetal seco fueron digeridas y su contenido de metal determinado por espectroscopia de absorción atómica. Esto se realizó utilizando llama aire-acetileno en un espectroscopio de absorción atómica marca PerkinElmer modelo Aanalyst 200. Además se analizó la concentración de metales en solución en muestras de medio de cultivo inicial para validar la concentración real de exposición y en muestras de medio de cultivo luego de haber contenido un ejemplar de las plantas por 24 hs.

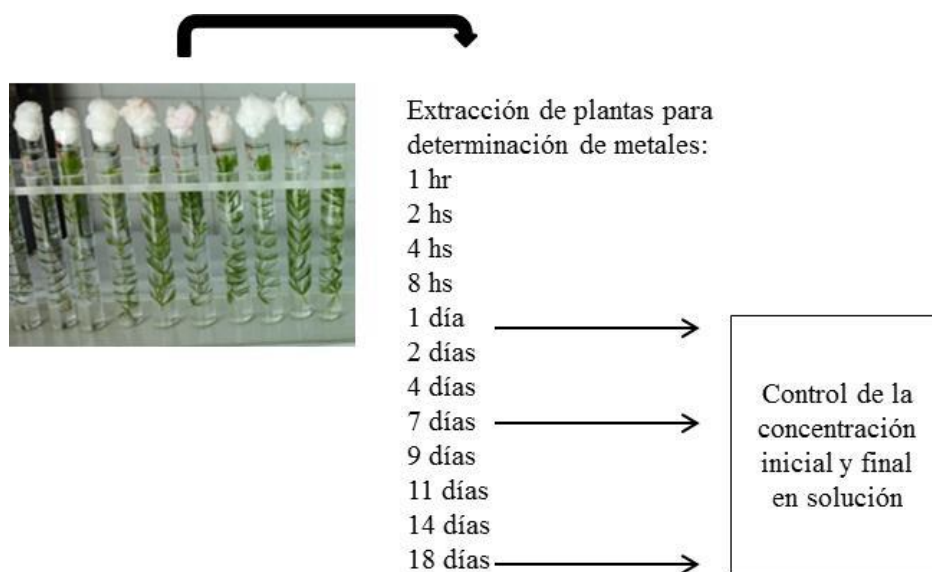


Figura 15. Esquema del cronograma de extracción de las plantas y de muestras de soluciones iniciales y finales para determinación del contenido de metales

5.9 Experiencia de fitoremediación de metales utilizando macrófitas acuáticas

5.9.1 Especies utilizadas

Las especies utilizadas en estas experiencias fueron, *Lemna gibba*, *Ceratophyllum demersum* y *Spirodela* sp. Esta última especie pertenece a la Familia Lemnaceae, siendo una macrófita flotante con frondes más grandes que los representantes del género *Lemna* presentando un sistema radicular menos desarrollado. Esta especie se mantiene en estanques artificiales en el campo de la Universidad a igual que las otras dos especies de macrófitas mencionadas.

5.9.2 Diseño experimental

Se preparó un efluente artificial con el agregado en forma simultánea de concentraciones conocidas de los tres metales estudiados, Zn, Ni y Cd. Esta solución se colocó en un acuario de 50 cm (altura) x 60 cm (largo) x 30 cm (ancho) junto con las distintas especies de macrófitas mencionadas en una relación de 10 grs de peso fresco de biomasa de cada una por litro de efluente artificial. De esta manera, se armó un sistema multi-metal y multi-específico.

Las concentraciones de metales que formaron este efluente artificial se seleccionaron en base a los umbrales de tolerancia a los metales individuales, obtenidos en los ensayos ecotoxicológicos que se describieron con anterioridad.

Este efluente artificial presentó concentraciones iniciales de Zn, Ni y Cd de 1, 3 y 1 mg/L, respectivamente. Las experiencias se realizaron a 22 °C de temperatura, fotoperiodo 12/12, intensidad lumínica de 2500 Lux/cm² con aireación. El tiempo establecido para el proceso de fitoremediación fue de 10 días, seleccionado en base a las tasas de remoción halladas en las experiencias de bioacumulación. Los acuarios se colocaron en un laboratorio climatizado.

Las macrófitas se extrajeron desde este sistema multi-metal, a tiempos regulares y fueron reemplazadas por nuevas plantas, teniendo en cuenta la cinética de remoción encontrada en las experiencias de bioacumulación realizadas con *Ceratophyllum*, para la exposición individual de cada uno de los metales. De esta manera a tiempo 0 y a intervalos regulares, se aplicó el siguiente esquema de extracción de muestras del efluente artificial y de macrófitas para la determinación de los tres metales en solución y en tejido vegetal

Cronograma de extracción de las muestras:

Tiempo 0: Preparación de efluente artificial. Determinación de metales en solución. Efluente inicial sin tratar.

48 hs: extracción de las plantas para digerir y determinación de metales en tejido. Extracción de muestra de solución para determinación de metales en solución. Agregado de nuevas plantas a la misma relación que la inicial (10 gr/L).

Día 6: realización de las mismas tareas.

Día 10. Realización de las mismas tareas. Efluente artificial final tratado por fitoremediación

5.9.3 Determinación de metales en solución y en el tejido vegetal

Las determinaciones de los metales se realizaron de acuerdo a lo indicado en el inciso 5.3., mediante espectroscopia de absorción atómica utilizando llama aire-acetileno u horno de grafito según correspondiera dependiendo de la sensibilidad necesaria. El equipo utilizado fue un espectroscopio de absorción atómica marca PerkinElmer modelo Analyst 200.

Las muestras de las soluciones, tanto de concentraciones iniciales como finales y a tiempos regulares, se filtraron al vacío con papel de filtro, se acidificaron a $\text{pH} \leq 2$ y se guardaron a 4°C hasta el momento de ser analizadas. Las condiciones de limpieza del material a utilizar fueron las mismas que las indicadas en el mencionado apartado.

La digestión del material vegetal proveniente de cada una de las especies de macrófitas, extraídas según el cronograma indicado con anterioridad, se realizó de acuerdo al método descrito en 5.8.3.2.

Se estimaron los factores de bioconcentración para cada especie y cada metal en los intervalos de tiempo mencionados, de acuerdo a la ecuación presentada en el ítem 5.8.3. Se estimaron también los porcentajes de remoción de cada metal de acuerdo a la expresión:

$$\% R = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100$$

C_0 y C_t , representan la concentración del metal al inicio y al tiempo t de cada intervalo, respectivamente.

Evaluación de la eficiencia en la fitoremediación del sistema multi-metal y multiespecífico.

A fin de evaluar la eficiencia de la remoción de los metales producida por las macrófitas, se realizaron ensayos de ecotoxicidad con el efluente artificial al inicio del proceso y al final del mismo. Estas evaluaciones ecotoxicológicas se realizaron con la especie de alga Chlorofita *Pseudokirchneriella subcapitata* y con el microcrustáceo Cladóceros *Daphnia magna*.

A continuación se presentan las condiciones experimentales de realización de los ensayos de ecotoxicidad utilizados.

Condiciones de los ensayos de ecotoxicidad de Inhibición de crecimiento algal con P. subcapitata:

1. Tipo de ensayo: Estático sin renovación
2. Duración del ensayo: 96 horas.
3. Temperatura: $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
4. Tipo de luz: blanca fría

5. Intensidad de luz: $86 \pm 8,6 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$
6. Fotoperiodo: luz continua
7. Tamaño de la cámara para ensayo: 250 mL.
8. Volumen de la solución para ensayo: 100 mL
9. Renovación de solución de ensayo: ninguna
10. Edad de los organismos para ensayo: 4 a 6 días
11. Número de organismos por cámara de ensayo: 1×10^6 células/mL.
12. Número de réplicas por concentración: 3
13. Régimen de alimentación: Sin alimentación.
14. Limpieza de cámara de ensayo: No es necesaria.
15. Aireación de la solución para ensayo: agitación continua de los cultivos a 100 c.p.m.
16. Medio control: medio nutritivo algal preparado con agua MilliQ
17. Agua de dilución: medio nutritivo algal
18. Factor de dilución: 0.5
19. Diluciones evaluadas (%): 6; 12.5; 25; 50; 100 %
20. Variable de respuesta: crecimiento (clorofila “a” *in vivo* por fluorescencia, densidad celular).
21. Criterio de aceptación del ensayo: A las 96 hs, 1×10^6 células/ml en los controles (mínimo). Coeficiente de variación entre réplicas menor o igual al 20%. Ensayos con dicromato de potasio como sustancia de referencia de EC50 96 hs: $0,98 \pm 0,14 \text{ mg/L}$

Condiciones de realización de los ensayos de ecotoxicidad con Daphnia magna:

1. Tipo de ensayo:
2. Duración del ensayo: 48 hs
3. Temperatura: $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
4. Calidad de luz: blanca fría
5. Fotoperíodo: 16 hs luz - 8 hs oscuridad.
6. Tamaño de la cámara para ensayo: 600 mL (máximo).
7. Volumen de la solución para ensayo: 400 mL (máximo).
8. Edad de los organismos para ensayo: Juveniles de menos de 24 horas de vida.
9. Número de organismos por cámara de ensayo: 10

10. Número de réplicas por concentración: 3
11. Número de organismos por concentración: 30
12. Régimen de alimentación: sin alimentación
13. Aireación de la solución para ensayo: No es necesaria.
15. Agua de dilución: Agua dulce artificial moderadamente dura, recomendada para el cultivo de *Daphnia* sp (pH = 8,0 - 8,3; conductividad = 0.610 – 0.660 mS/cm; dureza= 120 - 150 mg CaCO₃/L; alcalinidad: 185 – 210 mg CaCO₃/L; O.D.= 7,2 – 7,5 mg O₂/L).
16. Diluciones evaluadas (%): 6; 12.5; 25; 50; 100
17. Variables registradas: inmovilidad
18. Criterio de aceptación del ensayo: A las 48 hs, supervivencia del 80% en controles.

Al final de los ensayos de ecotoxicidad realizados con el efluente artificial al inicio y al final del proceso de fitoremediación, se estimaron las CE50 con ambos organismos. La comparación entre ellos se utilizó para evaluar la reducción de la ecotoxicidad de la mezcla y por ende el proceso de remoción de metales.

5.10 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos fueron analizados respecto al cumplimiento de normalidad mediante el test de Bartlett y de homogeneidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilks. En caso de superados estos requisitos, el análisis de las diferencias observadas entre grupos tratados y los controles fue realizado mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor combinado con los test de comparaciones múltiples Dunnett y/o Tuckey (Zar 2010; Sparks 2000) mediante la utilización del programa de computación TOXSTAT V 3.5 (West Inc and Gulley, 1996). La comparación entre pares se realizó mediante t- student entre los tratados y control. Los índices de toxicidad CE50, fueron determinados mediante la función Solver de Microsoft Excel versión 2010. La estimación del CME0 y CENO se realizó utilizando el test de Dunnet (Sparks 2000, Zar 2010).

La evaluación de la interacción entre los componentes de mezclas binarias y trinarias, fue realizado mediante el análisis de regresiones múltiples utilizando el programa SigmaPlot.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la acción de metales sobre *Lemna gibba*

Las evaluaciones que se realizaron de la acción del Níquel, Zinc y Cadmio sobre la especie *L. gibba*, contemplaron estudios donde se estudiaron los metales mencionados en forma individual y luego en forma de mezclas, que incluyeron estudios de combinaciones de dos metales (mezclas binarias) y de tres metales (mezclas trinarias).

A continuación se describen los estudios realizados sobre los distintos parámetros de la acción de los metales en forma individual.

6.1.1 Efectos de los metales en forma individual

Se determinaron efectos sobre el crecimiento, que incluyeron la determinación del número de frondes y peso fresco, a partir de los cuales se estimaron distintas variables de respuesta como: tasa de crecimiento específica (μ), porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento específica (% Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (% Iy) y porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (% Inb) y efectos sobre caracteres morfométricos como área y la longitud del eje longitudinal y transversal de cada una de las frondes individuales de las plantas control y las tratadas. También se evaluó el grado de desagregación de las colonias, mediante el cálculo de la Relación frondes/colonias, el contenido en Clorofila “a”, “b” y carotenoides y biomarcadores, que incluyeron la actividad de las enzimas vinculadas al estrés oxidativo, Catalasas (CAT), Ascorbato Peroxidasa (APOX) y Guayacol Peroxidasa (GPOX).

En primer lugar se describirán los resultados obtenidos acerca de la acción del Níquel sobre *L. gibba*, mientras que posteriormente se describirán los resultados obtenidos de la acción del Zinc y del Cadmio.

6.1.1.1 Efectos del Níquel

Efectos sobre el crecimiento

Se pudo evidenciar un efecto sobre el crecimiento para todos los parámetros evaluados a causa de las exposiciones con Ni sobre las plantas de *L. gibba* (Tabla 10). La tasa de crecimiento (μ) estimada en base al número de frondes, decreció a medida que incrementa la concentración de exposición llegando a un valor de 0 para la máxima evaluada en este estudio (11.82 mg/L) (Tabla 10). El porcentaje de inhibición de dicha tasa (%Ir) fue en un rango de 6.60 a 100%. En la menor concentración (0.18 mg/L), se observó una estimulación en este parámetro del 3.1%, aunque no fue estadísticamente significativo con respecto al control (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$). Las tasas de crecimiento de las plantas expuestas a las 5 mayores concentraciones, es decir desde 0.92 en adelante fueron significativamente menores que la del control. La tasa de crecimiento basada en el peso fresco, también decreció al aumentar la concentración, aunque la inhibición de la misma llegó a un máximo de 81.2 % para la concentración mayor. Según este parámetro, también se observó una estimulación del crecimiento del 5.99% a la concentración más baja. La única tasa de crecimiento que fue significativamente menor que el control fue la de las plantas expuestas a 11.82 mg/L. Por otro lado, las tasas de crecimiento basadas en el área total resultaron ser significativamente menores que la del control desde la concentración 0.92 mg/L en adelante. Para este parámetro, el % Ir se encontró en un rango entre 10 y 74.3 %.

El porcentaje de inhibición del rendimiento (%Iy), basándose en el número de frondes, presentó un rango de entre 12.7 a 100 %, observándose un incremento del rendimiento del 4.7% en la menor concentración respecto al control (Tabla 10). Cuando se evaluó el peso fresco, el rendimiento fue significativamente menor que el control para las 5 mayores concentraciones, y la máxima inhibición (87.2%) se correspondió con la máxima concentración evaluada. Para el área, al analizar el rendimiento, se observó que todas las concentraciones, a excepción de la menor, tuvieron una inhibición significativa respecto del control (Tabla 10).

En concordancia con los resultados recién descriptos, se observó una inhibición (%Inb) significativa para la concentración 0.92 mg/L y mayores, para número de frondes y peso

fresco. Para el área total, el %I_{nb} presentó un máximo de solo el 66.3% para la máxima concentración, pero todas difirieron significativamente respecto del control a excepción de la menor (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%I_r), porcentaje de reducción en rendimiento (%I_y) y porcentaje de inhibición (%I_{hb}) considerando número de fronde (a), peso fresco (b) y área total (c) de las plantas expuestas a distintas concentraciones de Ni (mg/L)

	Ni mg/L							
	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6	11.82
μ (a)	0.200	0.207	0.187	0.113*	0.090*	0.058*	0.041*	0*
%I _r (a)		3.1**	6.60	43.5*	56.1*	71.1*	80.1*	100*
%I _y (a)		4.7**	12.7	61.1*	71.7*	83.9*	89.3*	100*
%I _{hb} (a)		3.54**	9.64	46.2*	54.2*	63.4*	67.4*	75.5*
μ (b)	0.200	0.212	0.196	0.123	0.146	0.097	0.123	0.037*
%I _r (b)		5.99**	1.76	38.62	27.1	51.5	38.4	81.2*
%I _y (b)		2.33	14.5	60.2*	48.1*	72.1*	60.6*	87.2*
%I _{hb} (b)		1.81	11.2	46.8*	37.4*	55.9*	47.1*	67.9*
μ (c)	0.208	0.184	0.160	0.130*	0.113*	0.08*	0.075*	0.052*
%I _r (c)		10.8	22.8	37.3*	45.3*	61.6*	64*	74.3*
%I _y (c)		20	37.5*	55.3*	61.9*	77.5*	79.1*	86.3*
%I _{hb} (c)		15.4	28.8*	42.6*	47.7*	59.6*	60.8*	66.3*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

(**) Porcentaje de estimulación

El número de frondes, que se ha utilizado al igual que el peso fresco y área total para calcular las distintas variables de respuesta explicadas en la tabla 10 y en los párrafos anteriores, es la principal variable de medición según el protocolo OECD (2006). Al analizar este parámetro, se pudo observar un leve incremento en el número de frondes de las plantas expuestas a la menor concentración de Ni (0.18 mg/L), aunque este no fue significativamente diferente del control (Figura 16). A partir de la siguiente concentración, se observa una disminución que se mantiene hasta 11.82 mg/L que es la mayor evaluada. Se observaron diferencias significativas con respecto al control en la concentración 0.92 mg/L y mayores (Figura 16).

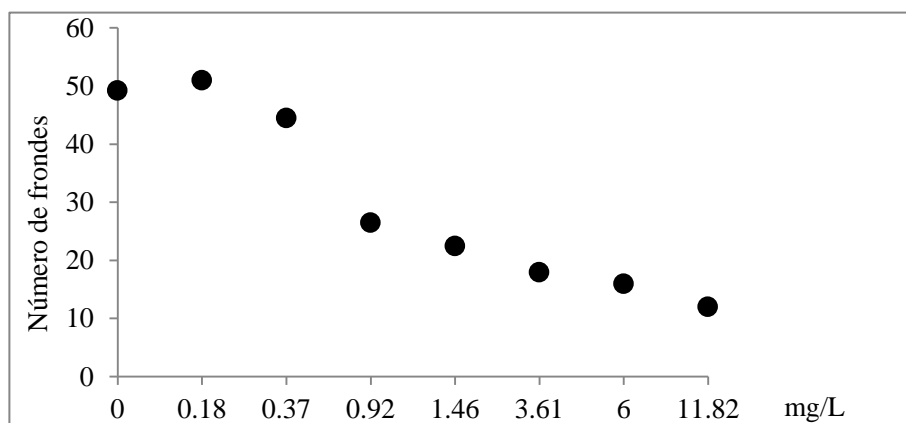


Figura 16. Número de frondes de *Lemna gibba* a las distintas concentraciones de Ni evaluadas.

Efectos sobre caracteres morfométricos

Área

Al analizar el área total, se observó que las plantas expuestas a la menor concentración (0.18 mg/L) no presentaron diferencias significativas respecto al control, sin embargo, a partir de la siguiente (0.37 mg/L) y para todas las mayores, las plantas presentaron diferencias significativas con el control (Tabla 11). Se vio una respuesta dependiente de la concentración donde el valor del área total decreció a medida que se aumentó la concentración de exposición. Como se explicó en materiales y métodos, el área total implica la sumatoria de todas las frondes presentes en cada tratamiento o control al momento de finalizado el ensayo de toxicidad. Por su parte, el área promedio implica dicha sumatoria dividido el número de frondes presentes en cada caso, es decir el área promedio de las frondes de cada tratamiento o control al cabo de los 7 días de exposición.

Tabla 11. Áreas totales (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Ni y control. Media entre tres réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Ni/L	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6	11.82
Media	232.4	196.7	165.2*	133.5*	121.6*	93.93*	90.84*	78.02*
D.E.	40.42	18.77	0.052	3.424	35.52	1.295	8.766	1.501
C.V.	0.17	0.09	0	0.02	0.28	0.01	0.09	0.01

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

En la tabla 12 se muestran los valores promedio de las áreas de las frondes de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Ni. Se observó una disminución del valor en las dos concentraciones menores, aunque éstas no presentaron diferencias significativas. A partir de 0.92 mg/L, se vio un incremento en el valor promedio de las áreas de las frondes, siendo esta diferencia significativa para la concentración mayor. Este aumento en el promedio del área podría explicarse por la ausencia de crecimiento de nuevas frondes hijas que lógicamente tienen un menor tamaño durante su desarrollo que las frondes madres, por lo tanto esta ausencia de frondes nuevas más pequeñas incrementó el promedio de área, ya que las presentes fueron en su mayoría frondes madres ya crecidas. En cuanto a esto hay que destacar que es a la concentración de 0.92 mg/L donde el área promedio se tornó mayor que para el control, y fue precisamente esta concentración la más baja que presentó una inhibición significativa respecto al control para el número de frondes, es decir una inhibición en el crecimiento de nuevas frondes.

Tabla 12. Valor promedio de área de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Ni y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Ni/L	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6	11.82
Media	4.81	3.85	3.71	5.27	5.35	5.37	5.71	6.5*
D.E.	0.75	0.26	0.17	0.59	0.4	0.29	0.46	0.12
C.V.	0.15	0.06	0.04	0.11	0.07	0.05	0.08	0.01

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

Con el fin de relacionar un parámetro de crecimiento con uno morfométrico, se analizó el incremento relativo de la tasa de crecimiento (basada en el número de frondes, por ser la variable de medición más importante según la norma OECD 2006) y del área, teniendo en cuenta todas las concentraciones analizadas. A medida que incrementó la concentración del metal en el medio, las plantas presentaron tasa de crecimiento más bajas, así como áreas totales menores. La relación entre ambos parámetros se corresponde con un ajuste lineal con un coeficiente de regresión de 0,90 (Figura 17).

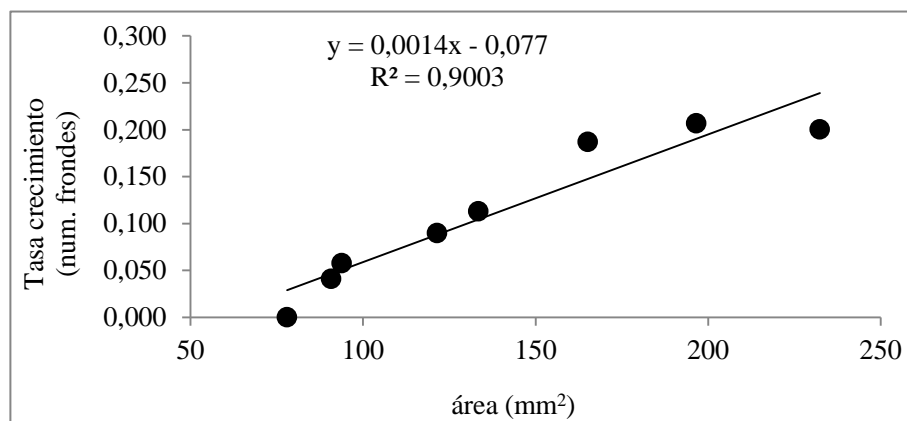


Figura 17. Relación entre tasa de crecimiento relativa y área foliar de *Lemna gibba* para todas las concentraciones de Ni estudiadas.

Eje longitudinal

Se analizó el eje longitudinal total, es decir la sumatoria de los ejes longitudinales de todas las frondes de cada uno de los tratados y control al cabo de los 7 días de exposición. Se observó que el valor del eje longitudinal total decreció a medida que se incrementó la concentración de exposición (Tabla 13). A partir de la concentración 0.92 mg/L inclusive, las diferencias con el control fueron significativas.

Tabla 13. Eje longitudinal total de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Ni y control. Media entre tres réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Ni/L	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6	11.82
Media	122	109.5	95.04	70.68*	61.78*	48.73*	46.17*	40.14*
D.E.	15	9.22	0.42	6.53	15.1	0.14	5.99	0.40
C.V.	0.12	0.08	0.004	0.09	0.2	0.002	0.12	0.009

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

Se calculó además, el valor promedio del eje longitudinal de las frondes, que como se explicó en la sección 5.7.2.12.3 de Materiales y Métodos, representa el eje longitudinal total de cada tratado o control dividido por el número de frondes en el momento de finalización del ensayo. En este caso se observó una disminución del promedio del eje longitudinal para las dos menores concentraciones (Tabla 14). A partir de las siguientes concentraciones los promedios fueron mayores que en el control, llegando a ser una

diferencia significativa en la mayor (11.82 mg/L), y representando en este caso un 32% de incremento respecto al control.

Tabla 14. Valor promedio del eje longitudinal de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Ni y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Ni/L	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6	11.82
Media	2.52	2.14	2.13	2.78	2.73	2.78	2.89	3.34*
D.E.	0.27	0.12	0.11	0.12	0.07	0.12	0.13	0.03
C.V.	0.1	0.05	0.05	0.04	0.02	0.04	0.04	0.008

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

Eje transversal

Además, se analizó el eje transversal total, es decir la sumatoria de los ejes transversales de todas las frondes de cada uno de los tratados y control al cabo de los 7 días de exposición. Se observó que el valor del eje transversal total decreció a medida que incrementó la concentración de exposición (Tabla 15). Al igual que para el caso del eje longitudinal total, a partir de la concentración 0.92 mg/L inclusive, las diferencias con el control fueron significativas.

Tabla 15. Eje transversal total de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Ni y control. Media entre tres réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Ni/L	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6	11.82
Media	105.5	101.8	85.85	55.91*	49.67*	39.15*	36.68*	30.56*
D.E.	9.78	6.64	3.57	5.16	13.33	0.58	5.86	0.23
C.V.	0.09	0.06	0.04	0.09	0.2	0.01	0.15	0.007

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

Se calculó además, el valor promedio del eje transversal de las distintas frondes, que como se explicó en la sección 5.7.2.12.3 de Materiales y Métodos, representa el eje transversal total de cada tratado o control dividido por el número de frondes en el momento de finalización del ensayo. En este caso se observó una disminución del promedio del eje transversal para las dos menores concentraciones, aunque en estos casos no hubo diferencia

significativa con el control (Tabla 16). A partir de la concentración 0.92 mg/L, se comienza a observar un aumento en el valor del promedio de este eje, aunque la diferencia es significativa únicamente en la concentración mayor (11.82 mg/L) representando en este caso un 16% de incremento respecto del control.

Tabla 16. Valor promedio del eje transversal de las frondes (mm^2) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Ni y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Ni/L	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6	11.82
Media	2.18	1.99	1.92	2.2	2.19	2.23	2.29	2.54*
D.E.	0.15	0.07	0.01	0.1	0.11	0.05	0.04	0.01
C.V.	0.06	0.03	0.005	0.04	0.05	0.02	0.01	0.003

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Se realizó una evaluación de la modificación del número de frondes por colonia para las mismas concentraciones. Para ello se calculó la relación frondes/colonias. Para este metal, no se observó un decrecimiento notorio de esta proporción, sino que este valor permaneció cercano al del control y ninguna de las concentraciones difirió significativamente del control (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$) (Tabla 17).

En concordancia con esto pudo verse al finalizar el ensayo que las colonias no estaban desagregadas, sino que las frondes se mantuvieron unidas aun en las concentraciones altas.

Tabla 17. Relación frondes/colonias para control y tratados

Concentración	Nº de frondes	Colonias	Relación Frondes/colonias
Control	49.25	12.75	3.8
0.18	51	14	3.6
0.37	44.5	16	2.7
0.92	26.5	7	3.8
1.46	22.5	5.5	4
3.61	18	4	4.5
6	16	4	4
11.82	12	4	3

Contenido en Clorofila "a", "b" y carotenoides

En cuanto al contenido de pigmentos, se observó una disminución, tanto para las clorofilas (a y b) como para los carotenoides, en todas las concentraciones respecto del control (Tabla 18). Para la clorofila “a”, todos los tratados difirieron significativamente del control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). El contenido de clorofila “b” fue significativamente inhibido en los tratados con 3.61 mg Ni/L (con un valor de 34 mg/g pf) y mayores; para el caso del contenido total de carotenoides, la menor concentración que difirió significativamente del control fue la de 6 mg Ni/L (con un valor de 66 mg/g pf). Trabajando en un rango de concentraciones similares, se ha observado que las especies de *Spirodela polyrhiza* y *Lemna minor* también presentaron un decrecimiento en el contenido de los pigmentos fotosintéticos, resultando especialmente sensible el contenido de clorofila “a” (al igual que en el presente trabajo donde respecto al control fue el pigmento más afectado), y donde encontraron que el sistema tilacoidal resultó muy afectado por el tratamiento con este metal, sobre todo por la presencia de gránulos de almidón en los cloroplastos (Appenroth et al. 2010). Se menciona en este mismo trabajo que no hay registros de que un tratamiento con Ni^{2+} genere una estimulación en el proceso de fotosíntesis, y que por lo tanto la acumulación de almidón sería una consecuencia de una inhibición del crecimiento debido a una menor demanda de carbohidratos. Estos autores observaron que el contenido de almidón decrece en las concentraciones más altas (similares a las empleadas aquí), lo cual podría deberse a una inhibición importante en la producción fotosintética lo que llevaría a una menor acumulación.

Tabla 18. Concentración de clorofila “a”, “b” y carotenoides totales (mg/g peso fresco).

	Tratamientos (mg Ni/L)						
	Cnt	0.18	0.37	0.92	1.46	3.61	6
Clorofila “a”	308 (64)	277 (39)	246 (32)	184* (14)	133* (22)	125* (30)	108* (6)
Clorofila “b”	82 (18)	73 (19)	65 (24)	54 (6)	47 (16)	34* (84)	33* (2)
Carotenoides	145 (11)	130 (9)	115 (12)	112 (7)	101 (27)	104 (20)	66* (4)

() Desvío estándar

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas de las dos concentraciones más bajas de los ensayos de crecimiento. En este caso las plantas expuestas a 0.18 mg Ni/L presentaron la misma concentración proteica que los controles mientras que las expuestas a 0.37 mg Ni/L una inhibición del 22 %, la cual no resultó estadísticamente significativa (test de Student $p>0.05$) (Tabla 19).

Tabla 19. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (mg Ni/L)		
	Cnt	0.18	0.37
Proteínas (mg/ml)	13.38	13.08	10.49
	(0.4)	(1.4)	(1.09)

() Desvío estándar

Efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes

Para este metal como para los demás, se evaluó la actividad enzimática en las mismas concentraciones que para la medición de proteínas.

Efectos sobre la actividad de CAT

Las plantas expuestas a la menor concentraciones de Ni (0.18 mg/L) presentaron una pequeña disminución de la actividad de la enzima antioxidante CAT respecto del control, a pesar de que no hubo una diferencia estadísticamente significativa (test de Student $p<0.05$) (Figura 18). En cambio, las plantas expuestas a 0.37 mg/L presentaron un incremento en la actividad de dicha enzima, tampoco siendo en este caso una diferencia significativa con el control. Esta enzima fue la menos activa en todas las concentraciones evaluadas, incluso en los controles. En un rango de concentraciones similares, Yilmaz y Parlak (2011) encontraron también en *L. gibba* que la actividad de esta enzima se incrementó con respecto al control al cabo de 7 días de exposición. Este incremento observado en la actividad de la CAT es probablemente debido a que se ha propuesto como indispensable en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (EROs) durante el estrés causado por metales, aunque esta se ubique únicamente en peroxisomas y no sea tan afín a su sustrato, el H_2O_2 como la APOX (Parlak y Yilmaz 2012).

Efectos sobre la actividad de APOX

Las plantas expuestas a la menor concentraciones de Ni (0.18 mg/L) presentaron un incremento de la actividad de la enzima antioxidante APOX respecto del control (Figura 18). A esta concentración se observó un 55% más de actividad con respecto al control, representando esta una diferencia significativa. Las plantas expuestas a la mayor concentración (0.37 mg/L) también presentaron un incremento de la actividad de dicha enzima respecto al control, mostrando en este caso un 130% más de actividad. Un resultado similar fue encontrado por Yilmaz y Parlak (2011) donde también en *L. gibba* la actividad de esta enzima fue incrementada respecto al control bajo una exposición a 0.05 mg Ni/L durante 7 días, mientras que en concentraciones mayores a las aquí evaluadas (10 y 20 mg/L), dicha actividad resultó inhibida.

Efectos sobre la actividad de GPOX

La enzima antioxidante GPOX fue la que presentó mayor actividad, tanto en los controles como en los tratados (Figura 18). Las plantas expuestas a la menor concentración (0.18 mg/L) presentaron un 23% más de actividad que los controles, aunque dicha diferencia no resultó significativa (test de Student $p > 0.05$). La actividad de la enzima en la mayor concentración evaluada (0.37 mg/L), presentó un 66% más de actividad respecto al control, siendo una diferencia significativa (test de Student $p < 0.05$).

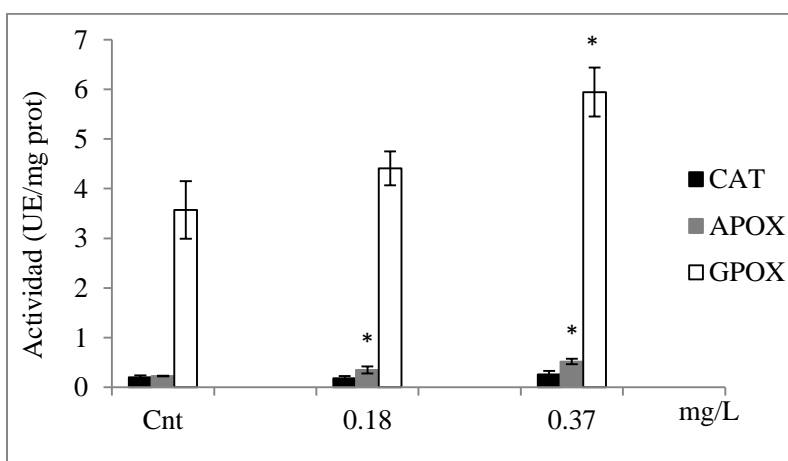


Figura 18. Actividad de CAT APOX y GPOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Ni. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Evaluación macroscópica de los ejemplares de L. gibba

Como complemento al análisis cuantitativo recién descrito, durante la duración completa del ensayo, se llevó a cabo una evaluación macroscópica con el fin de observar y remarcar las características significativas que más se vieron afectadas que pudieran ser observadas a simple vista. Para el caso del Ni, ya se ha mencionado lo referido a la ausencia de desintegración anormal de las colonias, donde no se observaron en general colonias de frondes aislados. Además, en las plantas expuestas a este metal no se vio una pérdida del color, sino que, independientemente de la concentración, se mantuvieron verdes y mantuvieron su gibosidad característica. Tampoco se apreció una destrucción de las raíces en ninguna de las concentraciones. En la figura 19 se muestran las plantas luego del período de 7 días de exposición para control, así como una concentración intermedia (1.46 mg/L) y la mayor (11.82 mg/L).

Similares resultados fueron encontrados por Appenroth et al. (2010) en *Spirodela polyrhiza* y *Lemna minor* expuestas a similares concentraciones de Ni^{2+} durante 7 días, donde observaron que las frondes madres permanecieron relativamente invariables sin pérdida de color, efecto que lo relacionan con no haber encontrado inducción de formación de gerontoplastos, es decir cloroplastos senescentes.



Figura 19. Plantas de *Lemna gibba* al cabo de los 7 días de exposición para control (izquierda), 1.46 mg/L (centro) y 11.82 mg/L (derecha).

Estimación de Índices de toxicidad

Con el fin de analizar la toxicidad de la exposición de *Lemna gibba* a distintas concentraciones de Ni durante 7 días, distintos índices fueron calculados basándose en número de frondes, peso fresco y área total (Tabla 20).

Tabla 20. Índices de toxicidad (mg/L) a los 7 días de exposición de *Lemna gibba* al Ni. Entre paréntesis se indican los límites de los intervalos de confianza del 95 %.

	Número frondes	Peso fresco	Área total
EC50 7-días	2.54 (1.39-4.69)	3.89 (2.86-5.56)	2.39 (2.21-2.79)
CENO	0.37	0.37	0.18
CME0	0.92	0.92	0.37

En cuanto al nivel de sensibilidad de las distintas variables de medida de las plantas expuestas al Ni, se observó que el valor de EC50 fue el más bajo para el área total (2.39 mg/L), con un valor no tan diferente, pero un poco mayor, le sigue la EC50 basada en número de frondes (2.54 mg/L); mientras que este índice presentó el mayor valor al ser calculado en base al peso fresco (3.89 mg/L) (Tabla 20). En la bibliografía se puede encontrar también variación en cuanto a las concentraciones de este metal toleradas por dicha especie. En este sentido ha sido comentado que la toxicidad del Ni²⁺ en especies de lentejas de agua es variable debido principalmente a las diferencias en las condiciones de los ensayos y especialmente al medio nutritivo (Appenroth et al. 2010). Khellaf y Zerdaoui (2010) observaron una reducción de 50 % en el índice de crecimiento de los frondes (evaluados según el área foliar) de plantas de la misma especie expuestas durante 4 días a 0.75 mg Ni/L. En tanto, en Parnian et al. (2016), se mostró que *L. gibba* podía no solo sobrevivir sino también remover el 50 % del Ni en el medio tras 14 días de exposición a 6 mg/L. Por otro lado Yilmaz y Parlak (2011) observaron que *L. gibba* es capaz de acumular y tolerar el Ni en un rango de concentraciones de 0.05 a 20 mg/L, en parte por un proceso de detoxificación de las especies reactivas del oxígeno mediante un sistema antioxidante eficiente.

Los índices CEMO y CMEO indicaron que, al analizar en base al número de frondes y peso fresco, no se observaron diferencias, indicando que estos parámetros resultaron igualmente sensibles. Sin embargo, al tener en cuenta el área total, estos índices resultaron

menores indicando una mayor sensibilidad de estos parámetros, para identificar efectos a largo plazo.

6.1.1.2 Efectos del Zn sobre los parámetros evaluados

Efectos sobre el crecimiento

Se observó un efecto sobre el crecimiento en las plantas expuestas a Zn para todos los parámetros evaluados. Se vio que, teniendo en cuenta el número de frondes, la tasa de crecimiento (μ) decreció a medida que se incrementó la concentración de exposición llegando a valer 0 para la máxima evaluada en este estudio (587 mg Zn/L) (Tabla 21). El rango de inhibición de dicha tasa fue de 4.83 a 100 %. En la menor concentración (2.3 mg/L), se vio una estimulación en el número de frondes con respecto al control (15.6%) aunque no hubo en este caso diferencia significativa. Las tasas de crecimiento de las plantas expuestas a las 6 concentraciones más grandes difirieron significativamente del control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). Por otro lado, la tasa de crecimiento evaluada en base al peso fresco también tuvo una inhibición del tipo dosis-respuesta, llegando a una inhibición máxima del 100 % a 587 mg/L. Por último, la tasa de crecimiento basada en área total fue la menos inhibida para este metal, llegando a un máximo del 76.9 % en las plantas expuestas a 587 mg/L (Tabla 21). A la concentración más baja evaluada, se observó un incremento en el área total respecto del control.

Al analizar el rendimiento, se observó un incremento del rendimiento para las tres variables de medida evaluadas a la concentración más baja (2.3 mg/L) (Tabla 21). Para el número de frondes, el rendimiento evaluado en las distintas concentraciones, presentó una inhibición con respecto al control en un rango entre 8.72 a 100 %. En cuanto al peso fresco, se observó una inhibición de rendimiento entre 23 y 100 %. Al evaluar el %I_y basado en área total, se observó que todas las concentraciones fueron inhibidas significativamente respecto del control, a excepción de la menor, llegando a un máximo del 87.8% en la máxima concentración (587 mg/L).

Complementando los efectos recién descriptos, se observó además una inhibición (%Inb) significativa para la concentración 20.1 mg/L y mayores, para número de frondes; mientras que fue a las concentraciones 9.2 mg/L y mayores donde se vio un efecto inhibitorio

significativo para peso fresco. Para el caso de área total, todas las concentraciones con excepción de la menor presentaron una inhibición significativa. Para este parámetro, en todas las variables de medida se observó una estimulación del crecimiento.

Tabla 21. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando número de fronde (a), peso fresco (b) y área total (c) de las plantas expuestas a distintas concentraciones de Zn (mg/L)

	Zn mg/L									
	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284	587
μ (a)	0.202	0.233	0.192	0.172	0.133*	0.124*	0.121*	0.045*	0.006*	0*
%Ir (a)		15.6**	4.83	14.6	33.8*	38.6*	40*	77.4*	97*	100*
%Iy (a)		32.9**	8.72	24.7	50.2*	55.6*	57*	88*	98.6*	100*
%Ihb (a)		24.9**	6.60	18.8	38.1*	42*	43*	66.5*	74.7*	75.5*
μ (b)	0.186	0.184	0.143	0.111	0.132	0.141	0.091*	0.048*	0.046*	-0.05*
%Ir (b)		1.48	23.4	40.3	29.3	24.3	50.8*	74.4*	75.4*	100*
%Iy (b)		17.1**	23	47*	52.9*	47.6*	72*	87.5*	88.3*	100*
%Ihb (b)		11.8**	15.9	32.4*	40.2*	36.2*	54.9*	66.8*	67.3*	79*
μ (c)	0.205	0.216	0.154	0.154	0.141	0.150	0.130*	0.100*	0.076*	0.047*
%Ir (c)		5.2**	24.7	25	31.2	26.6	36.3*	51*	62.8*	76.9*
%Iy (c)		9.44**	39.6*	39.8*	47.7*	42.1*	53.6*	68.4*	78.1*	87.8*
%Ihb (c)		7.19**	30.2*	30.5*	36.4*	32.1*	40*	52.2*	59.5*	67*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

(**) Porcentaje de estimulación

Para este metal también se analizó el efecto sobre el número de frondes, ya que es la principal variable de medición según el protocolo OECD (2006). En este caso, se pudo observar un incremento en el número de frondes de las plantas expuestas a la menor concentración de Zn (2.3 mg/L), aunque este no fue significativamente diferente del control (Figura 20). A partir de la siguiente concentración, se observa una disminución que se mantiene hasta 587 mg/L que es la mayor evaluada. Se observaron diferencias significativas desde la concentración 20.1 mg/L inclusive.

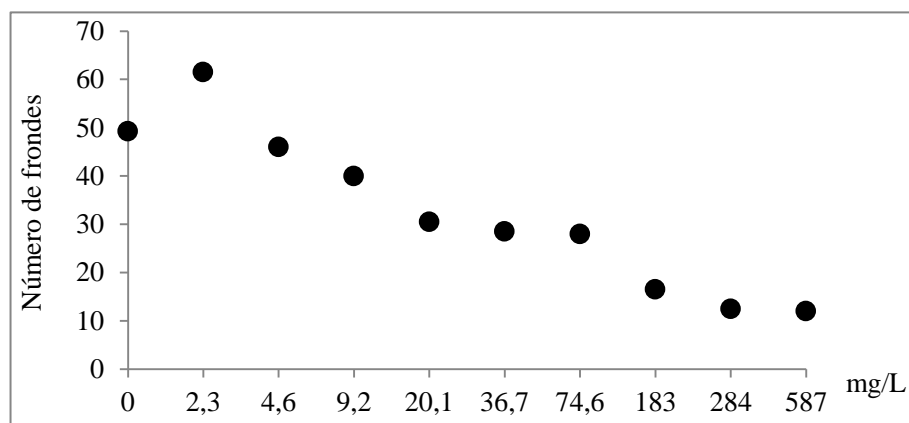


Figura 20. Número de frondes de *Lemna gibba* a las distintas concentraciones de Zn evaluadas.

Efectos sobre caracteres morfométricos

Área

Para el Zn, también fueron analizadas el área total y el área promedio de las frondes, las cuales fueron definidas previamente. Al analizar el área total, se observó que todas las concentraciones, con excepción de la menor, tuvieron diferencias significativas con el control (Tabla 22). En las plantas expuestas a 2.3 mg/L el área fue mayor que en el control, aunque sin ser esta una diferencia significativa. A partir de la concentración 4.6 mg/L se vio una respuesta dependiente de la concentración donde el valor del área total decreció a medida que aumentó la concentración de exposición.

Tabla 22. Áreas totales (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Zn y control. Media entre réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Zn/L	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284	587
Media	218.9	234.7	152.6*	152.2*	139.2*	148.4*	129.1*	104.7*	88.43*	72.23*
D.E.	25.1	12	16.8	10	21	0.8	4.3	19.8	4.9	14.2
C.V.	0.11	0.05	0.11	0.06	0.15	0.005	0.03	0.18	0.05	0.19

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

En la tabla 23 se muestran los valores promedio de las áreas que tuvieron las frondes de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Zn. Se observó una disminución del

valor en las tres concentraciones menores, aunque éstas no presentaron diferencias significativas. A partir de 20.1 mg/L, se vio un incremento en el valor promedio de las áreas de las frondes, siendo esta diferencia significativa para las tres mayores concentraciones.

Tabla 23. Valor promedio de área de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Zn y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Zn/L	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284	587
Media	4.3	3.8	3.3	3.8	4.5	5.2	4.6	6.3*	6.8*	6*
D.E.	0.48	0.06	0.04	0.1	0.3	0.1	0.8	0.3	0.3	1.1
C.V.	0.11	0.01	0.01	0.02	0.06	0.01	0.17	0.04	0.04	0.18

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Con el fin de relacionar un parámetro de crecimiento con uno morfométrico, se analizó el incremento relativo de la tasa de crecimiento (basada en el número de frondes) y del área, teniendo en cuenta todas las concentraciones analizadas. A medida que incrementó la concentración del metal en el medio, las plantas presentaron tasa de crecimiento más bajas, así como áreas totales menores. La relación entre ambos parámetros se corresponde con un ajuste lineal con un coeficiente de regresión de 0,85 (Figura 21).

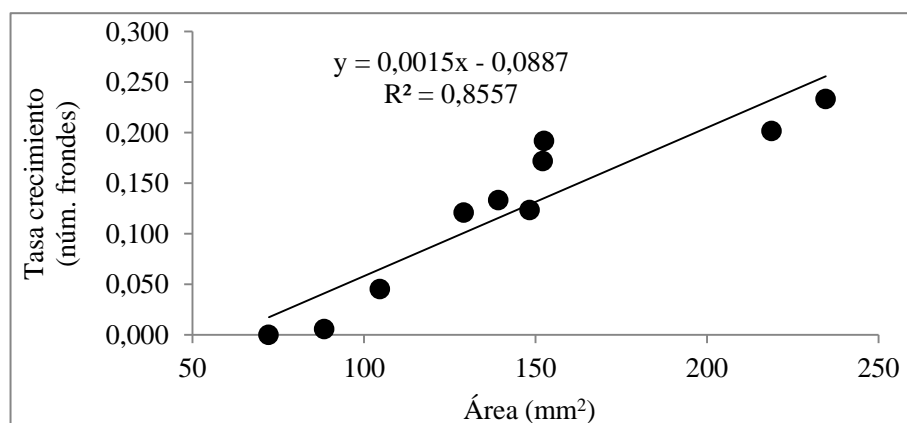


Figura 21. Relación entre tasa de crecimiento relativa y área foliar de *Lemna gibba* para todas las concentraciones de Zn estudiadas.

Eje longitudinal

Al analizar el eje longitudinal total, se observó que su valor decreció a medida que incrementó la concentración de exposición a partir de la concentración 4.6 mg/L; mientras que a la menor concentración (2.3 mg/L) dicho valor incrementó aunque no significativamente respecto del control (Tabla 24). A partir de la concentración 9.2 mg/L inclusive, las diferencias con el control fueron significativas.

Tabla 24. Eje longitudinal total de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Zn y control. Media entre réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Zn/L	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284	587
Media	122.1	136.5	94.23	88.01*	77.92*	78.44*	69.18*	48.28*	42.57*	35.98*
D.E.	14	4.3	11.5	5	8	2.3	3.6	10	0.8	3.4
C.V.	0.11	0.03	0.12	0.05	0.10	0.02	0.05	0.20	0.01	0.09

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

Se calculó además, el valor promedio del eje longitudinal de las distintas frondes. En este caso se observó un decrecimiento del promedio del eje longitudinal para las tres menores concentraciones; en estos casos las diferencias no fueron significativas (Tabla 25). A partir de las siguientes concentraciones los promedios fueron mayores que en el control, llegando a ser una diferencia significativa en las dos mayores (284 y 587 mg/L), representando un incremento del 37 y 25 % respectivamente.

Tabla 25. Valor promedio del eje longitudinal de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Zn y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Zn/L	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284	587
Media	2.40	2.22	2.05	2.20	2.55	2.75	2.49	2.91	3.29*	2.99*
D.E.	0.26	0.01	0.01	0.01	0.06	0.01	0.24	0.23	0.29	0.28
C.V.	0.10	0	0	0	0.02	0	0.09	0.07	0.08	0.09

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

Eje transversal

Se observó que el valor del eje transversal total decreció a medida que incrementó la concentración de exposición a partir de la concentración 4.6 mg/L; mientras que a la menor concentración (2.3 mg/L) dicho valor incrementó aunque no significativamente respecto del control (Tabla 26). Este parámetro morfométrico fue más afectado que el eje longitudinal, ya que la menor concentración a la que se detectaron efectos inhibitorios significativos con respecto a lo control fue 4.6 mg/L, es decir una menor que en el caso del eje longitudinal.

Tabla 26. Eje transversal total de las frondes (mm^2) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Zn y control. Media entre réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Zn/L	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284	587
Media	110.7	122.1	82.2*	77*	69.4*	68.1*	60.7*	44*	35.1*	29.3*
D.E.	13.4	4.6	10.7	3	10.4	1	7.1	6.4	1	3.9
C.V.	0.12	0.03	0.13	0.03	0.14	0.01	0.11	0.14	0.02	0.13

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Se calculó además, el valor promedio del eje transversal de las distintas frondes. Al igual que para el promedio del eje longitudinal, se observó en este caso un decrecimiento del promedio del eje transversal para las tres menores concentraciones, aunque en estos casos no hubo diferencia significativa con el control (Tabla 27). A partir de la concentración 20.1 mg/L, se observa una tendencia a valores mayores del promedio de este eje, siendo la diferencia significativa con el control en las concentraciones 183 y 284 mg/L, representando un incremento del 23 y 25 % respectivamente.

Tabla 27. Valor promedio del eje transversal de las frondes (mm^2) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Zn y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Zn/L	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284	587
Media	2.17	1.98	1.78	1.92	2.25	2.38	2.17	2.66*	2.71*	2.44
D.E.	0.16	0.01	0.01	0.01	0.15	0.02	0.07	0.04	0.21	0.32
C.V.	0.07	0	0	0	0.06	0.01	0.03	0.01	0.07	0.13

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Con respecto a la evaluación de la desintegración de las colonias, se observó un aumento en la relación frondes/colonias en las 3 menores concentraciones estudiadas con respecto al control, aunque esta diferencia no fue significativa (Tabla 28). A partir de la concentración 20.1 mg/L, la relación fue decreciendo a medida que aumentó la cantidad de metal en el medio; siendo esto un indicador de la tendencia hacia colonias con menos frondes a medida que la concentración de exposición fue mayor. Se encontró una disminución significativa para dicho índice de las plantas expuestas a las cuatro mayores concentraciones.

Tabla 28. Relación frondes/colonias para control y tratados.

Concentración	Nº de frondes	Colonias	Relación Frondes/colonias
Control	49.25	13.3	3.70
2.3	61.5	15	4.19
4.6	46	9.5	4.83
9.2	40	9	4.44
20.1	30.5	12	2.54
36.7	28.5	11	2.59
74.6	28	12	2.33*
183	16.5	11.5	1.43*
284	12.5	8.5	1.47*
587	12	10.5	1.15*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Clorofila “a”, “b” y carotenoides

En cuanto al contenido de pigmentos, se observó una disminución, tanto para las clorofilas (a y b) como para los carotenoides, en todas las concentraciones respecto del control (Tabla 29). Para la clorofila “a”, los tratamientos de las cuatro mayores concentraciones (74.6, 183, 284 y 587 mg/L) difirieron significativamente del control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). Los contenidos de clorofila “b” y total de carotenoides, también fueron significativamente inhibidos en los cuatro tratamientos más concentrados. Ha sido propuesto que el Zn se acumula preferentemente en cloroplastos, donde puede directamente interactuar con las membranas tilacoides (Radic et al. 2009). El decrecimiento marcado en los pigmentos fotosintéticos observado en las plantas expuestas a Zn, el cual fue mayor que

para el caso de los demás metales evaluados, respalda esta hipótesis. En el trabajo de Parlak y Yilmaz (2012), donde trabajaron también con la especie *L. gibba*, se observó que el contenido de clorofila “a”, “b” y carotenoides fue afectado significativamente por un tratamiento con 1.5 mg Zn/L durante 7 días donde se observó una disminución en el contenido de estos pigmentos con respecto al control, y donde se planteó que esta disminución podría estar atribuida a la inhibición inducida por este metal de la biosíntesis de clorofila causada por una deficiencia nutricional, como por ejemplo de Fe.

Tabla 29. Concentración de clorofila “a”, “b” y carotenoides totales (mg/g peso fresco).

	Tratamientos (mg Zn/L)								
	Cnt	2.3	4.6	9.2	20.1	36.7	74.6	183	284
Clorofila “a”	272 (50)	277 (49)	246 (32)	220 (14)	138 (22)	127 (25)	72* (14)	45* (3)	35* (6)
Clorofila “b”	66 (13)	65 (15)	64 (24)	58 (4)	49 (9)	53* (9)	30* (6)	33* (5)	28* (4)
Carotenoides	119 (20)	118 (11)	113 (12)	112 (9)	99 (14)	101 (19)	46* (5)	58* (10)	42* (7)

() Desvío estándar

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas de las dos concentraciones más bajas de los ensayos de crecimiento. Las plantas expuestas a 2.3 mg Zn/L presentaron un menor contenido proteico que los controles con una inhibición del 25 %. Por su parte, la concentración de 4.6 mg Zn/L presentó una concentración aún menor con un 32% de inhibición respecto al control. En ambos casos las diferencias no fueron estadísticamente significativas (test de Student $p > 0.05$) (Tabla 30). Parlak y Yilmaz (2012) también observaron un decrecimiento del contenido de proteína soluble total en las especies *L. gibba* y *L. minor* expuestas a 1.5 mg Zn/L durante 7 días respecto del control, y plantearon que dicho crecimiento luego de una exposición prolongada a este metal podría deberse a una actividad incrementada de proteasas u otras enzimas catabólicas que son activadas por metales pesados.

Tabla 30. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (mg Zn/L)		
	Cnt	2.3	4.6
Proteínas (mg/ml)	13.38 (0.4)	10.04 (1.77)	8.98 (1.46)

() Desvío estándar

*Efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes**Efectos sobre la actividad de CAT*

Las plantas expuestas a la menor concentraciones de Zn (2.3 mg/L) presentaron un pequeño incremento de la actividad de la enzima antioxidante CAT respecto del control, a pesar de que no hubo una diferencia estadísticamente significativa (test de Student $p < 0.05$) (Figura 22). El incremento de la actividad fue mayor aún en las plantas expuestas a 4.6 mg/L, aunque tampoco siendo en este caso una diferencia significativa con el control. Esta enzima fue la menos activa en todas las concentraciones evaluadas, incluso en los controles. Estudios realizados en *Phaseolus vulgaris* demostraron que concentraciones similares a las evaluadas en el presente trabajo no provocaron una diferencia significativa de la actividad de CAT con respecto a controles en raíz, tallo y hojas (Chaoui et al. 1997). Por su parte en Radic et al. (2009) se observó una disminución de la actividad de esta enzima en *L. minor* expuesta a 19 y 9.5 mg Zn/L, las cuales son mayores que las evaluadas en el presente trabajo.

Efectos sobre la actividad de APOX

Las plantas expuestas a la menor concentraciones de Zn (2.3 mg/L) presentaron un incremento de la actividad de la enzima antioxidante APOX respecto del control (Figura 22). A esta concentración se observó un 77% más de actividad con respecto al control, representando esta una diferencia significativa. Las plantas expuestas a la mayor concentración (4.6 mg/L) también presentaron un incremento de la actividad de dicha enzima respecto al control, mostrando en este caso un 84% más de actividad. Esta enzima fue la que presentó, proporcionalmente al control, el mayor incremento de la actividad en los tratados con Zn. Estos hallazgos concuerdan con lo encontrado por Parlak y Yilmaz

(2012) donde esta enzima fue la que mostró un mayor incremento respecto del control en plantas de *L. gibba* expuestas a 1.5 mg Zn/L durante 7 días comparando con las enzimas CAT y GPOX.

Efectos sobre la actividad de GPOX

La enzima antioxidante GPOX fue la que presentó mayor actividad, tanto en los controles como en los tratados (Figura 22). Las plantas expuestas a la menor concentración (2.3 mg/L) presentaron un 10% más de actividad que los controles, aunque dicha diferencia no resultó significativamente significativa. La actividad de la enzima en la concentración más alta evaluada (4.6 mg/L) presentó un 17% más de actividad respecto al control, tampoco siendo una diferencia significativa. Estos resultados están en concordancia con lo encontrado por Parlak y Yilaz (2012) donde mostraron que para *L. gibba*, la actividad de la esta enzima incrementó con respecto al control en plantas expuestas entre 0.01 y 1.5 mg Zn/L durante 7 días con respecto al control. Las peroxidasas están relacionadas con reacciones de oxidación correspondientes con un incremento de peróxidos y radicales libres en las células de las plantas debido a estrés causado por metales. Por lo tanto una actividad incrementada de las peroxidasas, bajo el estrés producido por los tratamientos con Zn, indicarían su rol en la detoxificación de H_2O_2 .

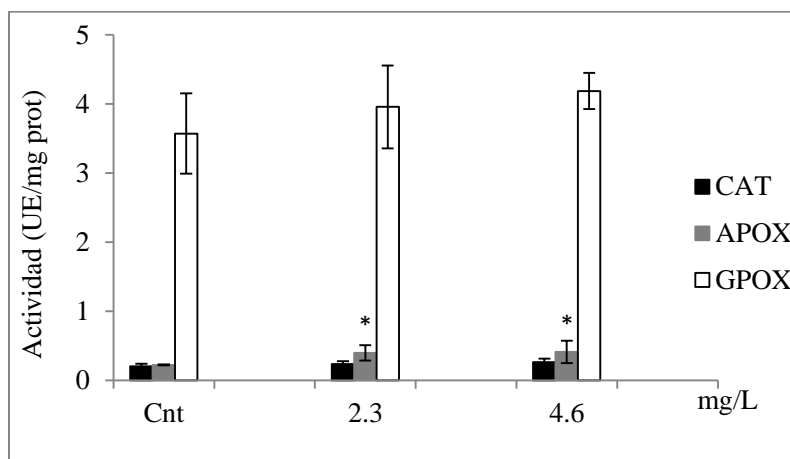


Figura 22. Actividad de CAT APOX y GPOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Zn. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Evaluación macroscópica de los ejemplares de L. gibba

Con respecto a la evaluación macroscópica de las plantas expuestas a Zn, se ha mencionado lo referido a la presencia de colonias con menor cantidad de frondes en las concentraciones más elevadas. Se observó gran cantidad de frondes aislados o colonias pequeñas de dos frondes en las concentraciones mayores (183, 284 y 587 mg Zn/L). Además se observó una clorosis bastante importante en las expuestas a las dos mayores concentraciones; presentando en estos casos un aspecto predominantemente blanquecino. Se apreció también en estas concentraciones una pérdida de la gibosidad característica. Además, las raíces se vieron bastante afectadas en las concentraciones mencionadas, incluso varias plantas carentes de ellas. En la figura 23 se muestran las plantas luego del período de 7 días de exposición para control, así como una concentración intermedia (36.7 mg/L) y la mayor (587 mg/L).

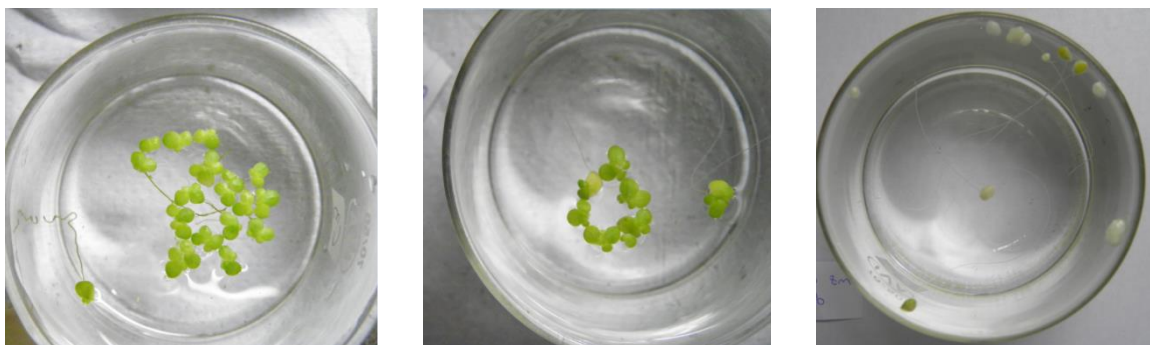


Figura 23. Plantas de *Lemna gibba* al cabo de los 7 días de exposición para control (izquierda), 36.7 mg/L (centro) y 587 mg/L (derecha).

Estimación de Índices de toxicidad

Con el fin de analizar la toxicidad de la exposición de *Lemna gibba* a distintas concentraciones de Zn durante 7 días, distintos índices fueron calculados basándose en número de frondes, peso fresco y área total (Tabla 31).

Tabla 31. Índices de toxicidad (mg/L) a los 7 días de exposición de *Lemna gibba* al Zn. Entre paréntesis se indican los límites de los intervalos de confianza del 95 %.

	Número frondes	Peso fresco	Área total
EC50 7-días	76.73 (54.32-111)	76.93 (73.64-80.85)	137 (66-295)
CENO	9.2	9.2	2.3
CME0	20.1	20.1	4.6

Para el Zn, por otra parte, se observó que las efectivas 50 calculadas según el número de frondes y peso fresco resultaron muy similares entre sí, con valores de 76.73 mg/L y 76.93 mg/L respectivamente. Mientras que la EC50 calculada en base al área total fue de 137 mg/L (Tabla 31). En otro trabajo, donde se evaluó el número de colonias en *Lemna gibba*, se obtuvo una inhibición del crecimiento de las plantas expuestas a 4 y 50 mg Zn/L del 50 y 79 % respectivamente (Megateli et al. 2009). Trabajando con *L. minor* Radic et al. (2009) mostraron una inhibición de la tasa de crecimiento relativa basada en el peso fresco del 20 y 35 % en plantas expuestas durante 15 días a 19 y 9.5 mg Zn/L respectivamente comparándolo con el control. Por otra parte, Khellaf y Zerdaoui (2009) concluyeron que *L. gibba* es efectiva para bioacumular Zn en concentraciones de 18 mg/L, a pesar de observarse una reducción en la biomasa con respecto a los controles. En el presente trabajo se encontró que, aunque la EC 50 en base al área total fue mayor, se observaron inhibiciones estadísticamente significativas en concentraciones menores que para el caso de número de frondes y peso fresco; esto puede observarse en los índices CEMO y CME0 estimados (Tabla 31), por lo cual, este parámetro resultaría más sensible en la estimación de toxicidad crónica.

6.1.1.3 Efectos del Cadmio sobre los parámetros evaluados

Efectos sobre el crecimiento

En la tabla 32 pueden observarse los efectos de la acción del Cd sobre los distintos parámetros de crecimiento valuados. Considerando el número de frondes, la tasa de crecimiento (μ) decrece a medida que incrementa la concentración de exposición. El porcentaje de inhibición de dicha tasa se presentó en un rango de 3.8 a 77.3 %, este último

valor alcanzado a la mayor concentración (33 mg/L) (Tabla 32). Las tasas de crecimiento de las 5 mayores concentraciones resultaron significativamente menores con respecto al control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). La tasa de crecimiento basada en el peso fresco, también decreció al aumentar la concentración y la inhibición de la misma fue un poco mayor que para el caso del número de frondes, alcanzando un 88.8% para la mayor concentración evaluada. Las tasas de crecimiento basadas en el área total resultaron ser significativamente menores que la del control para la concentración 2.06 mg/L y mayores. La máxima inhibición de la tasa de crecimiento (78.8%) se observó para la mayor concentración. El porcentaje de inhibición del rendimiento basado en el número de frondes presentó un rango de entre 6.9 a 88.4 %, resultando significativamente diferentes al control las 5 mayores concentraciones (Tabla 32). El rendimiento se vio más afectado al analizar en base al peso fresco, parámetro para el cual se observaron diferencias significativas con respecto al control para todas las concentraciones, con excepción de la menor, y se alcanzó una inhibición máxima del 95.6%. Más afectado aún resultó el rendimiento cuando se analizó en base al área total, donde se observó que todas las concentraciones evaluadas difirieron significativamente del control (Tabla 32).

En concordancia con los resultados recién descritos, se observó una inhibición (%Inb) significativa para la concentración 2.06 mg/L y mayores para número de frondes. El porcentaje de inhibición en el caso del peso fresco fue inhibido significativamente, al igual que el rendimiento, en todas las concentraciones con excepción de la menor, alcanzando en este caso un %Inb del 80.5% a 33 mg/L.

Para el área total, el %Inb presentó un máximo de solo el 66.3% para la máxima concentración, pero todas difirieron significativamente respecto del control a excepción de la menor. Todas las concentraciones presentaron una inhibición significativa cuando se evaluó en base al área total, en un rango entre 15.1 a 67.7 %.

En el presente trabajo se ha observado una toxicidad por parte de los tratamientos con Cd en la especie *Lemna gibba* que se manifestó en un crecimiento reducido de todos los parámetros evaluados. Dicha inhibición del crecimiento podría deberse a que dicho metal puede afectar enzimas relacionadas a rutas de asimilación del azufre, el cual es un macronutriente esencial en la nutrición de las plantas (Gallego et al. 2012). Dentro de las células de la planta, el Cd se encuentra unido a ligandos que contienen azufre como los

presentes en glutatión, metalotioneinas y fitoquelatinas. En este sentido, la falta de azufre en el interior de la planta lleva a la limitación de la producción de cisteína que es el principal producto de la asimilación del azufre, mientras que a su vez, este aminoácido es el factor limitante de la velocidad de síntesis del glutatión que es el antioxidante que contiene azufre más importante el cual actúa como un buffer redox y llevando a cabo un rol esencial en el metabolismo y tolerancia al estrés (Gallego et al. 2012). Trabajando con *Arabidopsis thaliana*, Perfus-Barbeoch et al. (2002) plantearon que concentraciones mayores a 1.12 mg Cd/L producen una fuerte reducción en el peso fresco de la planta, y que esto podría deberse a un decrecimiento de la incorporación de CO₂ producido por una inducción en el cierre estomático. Por otra parte ha sido mencionado el ya conocido fenómeno de que los iones Cd²⁺ tienen la capacidad de reemplazar los iones Ca²⁺ del centro de reacción del fotosistema II, causando una inhibición de la fotoactivación de este fotosistema lo cual tiene efectos drásticos sobre las plantas en cuanto al crecimiento y la obtención de energía (Sharma y Dietz 2009). Por otra parte, la fitotoxicidad del Cd²⁺ ha sido asociada con inhibición del crecimiento y estrés oxidativo en plantas, y ha sido mencionado que aun siendo un metal inactivo en reacciones de óxido-reducción, es capaz de promover la acumulación de especies reactivas del oxígeno (EROs), ya sea por decrecimiento en el sistema defensivo antioxidante o un efecto relacionado con enzimas generadoras de EROs o algún otro mecanismo no tan claro (Pena et al. 2012). Estos mismos autores sostienen que la producción de EROs en plantas durante un estrés causado por Cd²⁺ parece ser dependiente de la especie, la concentración del metal y el tiempo de exposición.

En cuanto al análisis del número de frondes al finalizar el ensayo, se observó que este decreció a medida que aumentó la concentración de exposición (Figura 24). A partir de la concentración 2.06 mg/L inclusive, se observó una inhibición significativa respecto al control.

Tabla 32. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa ($\%I_r$), porcentaje de reducción en rendimiento ($\%I_y$) y porcentaje de inhibición ($\%I_{hb}$) considerando número de fronde (a), peso fresco (b) y área total (c) de las plantas expuestas a distintas concentraciones de Cd (mg/L)

		Cd mg/L								
	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
μ (a)	0.219	0.211	0.205	0.208	0.209	0.186*	0.168*	0.165*	0.142*	0.05*
$\%I_r$ (a)		3.8	6.1	4.9	4.4	15.1*	23.1*	24.8*	35*	77.3*
$\%I_y$ (a)		6.9	11.5	9.19	8.04	26.3*	37.8*	40.1*	52.9*	88.4*
$\%I_{hb}$ (a)		5.41	9.01	7.21	6.31	20.6*	29.6*	31.4*	41.4*	69.4*
μ (b)	0.263	0.231	0.194	0.192	0.153*	0.111*	0.09*	0.094*	0.047*	0.029*
$\%I_r$ (b)		12.1	26.1	26.9	41.9*	57.7*	65.9*	64.1*	82*	88.8*
$\%I_y$ (b)		23.6	45.3*	46.4*	63.8*	77.9*	83.4*	82.3*	92.6*	95.6*
$\%I_{hb}$ (b)		19.9	38.1*	39*	53.6*	65.5*	70.3*	69.2*	78*	80.5*
μ (c)	0.205	0.182	0.175	0.166	0.171	0.143*	0.124*	0.136*	0.094*	0.043*
$\%I_r$ (c)		11.2	14.7	19	16.6	30.3*	39.5*	33.5*	53.8*	78.8*
$\%I_y$ (c)		19.8*	24.2*	31.7*	28.3*	46.7*	56.9*	50.4*	70.6*	88.7*
$\%I_{hb}$ (c)		15.1*	19*	24.3*	21.6*	35.5*	43.4*	38.5*	53.8*	67.7*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

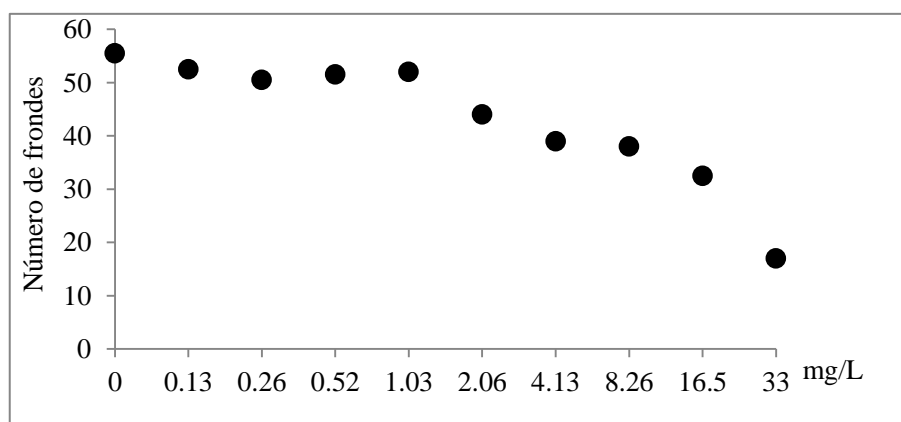


Figura 24. Número de frondes de *Lemna gibba* a las distintas concentraciones de Cd evaluadas.

*Efectos sobre caracteres morfométricos**Área*

Al analizar el área total, se vio una respuesta dependiente de la concentración donde el valor del área total tuvo una tendencia a decrecer a medida que se aumentó la concentración de exposición (Tabla 33). Se observó para todas las concentraciones, con excepción de la menor (0.13 mg/L), que las plantas presentaron una inhibición estadísticamente significativa en el área total con respecto al control.

Tabla 33. Áreas totales (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd y control. Media de tres réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Cd/L	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
Media	201	171	163*	152*	157*	130*	114*	123*	92*	65*
D.E.	22.5	6.4	17.4	6.8	3.5	0.03	4.9	4.1	9.5	9.9
C.V.	0.11	0.03	0.10	0.04	0.02	0	0.04	0.03	0.10	0.15

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

En la tabla 34 se muestran los valores promedio de las áreas que tuvieron las frondes de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd. Se observó que en general hay una tendencia hacia frondes más pequeñas, aunque no se apreciaron diferencias significativas con el control salvo para la concentración 2.06 mg/L.

Tabla 34. Valor promedio de área de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Cd/L	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
Media	3.62	3.68	3.25	2.96	2.77	2.59*	2.92	3.26	2.85	3.83
D.E.	0.08	0.14	0.57	0.09	0.06	0.33	0.02	0.23	0.11	0.59
C.V.	0.02	0.03	0.17	0.03	0.02	0.12	0	0.07	0.03	0.15

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

En la figura 25 se muestra la relación entre un parámetro de crecimiento con uno morfométrico. Se analizó el incremento relativo de la tasa de crecimiento basada en el

número de frondes y del área, teniendo en cuenta todas las concentraciones analizadas. A medida que incrementó la concentración del metal en el medio, las plantas presentaron tasa de crecimiento más bajas, así como áreas totales menores. La relación entre ambos parámetros se corresponde con un ajuste lineal con un coeficiente de regresión de 0,82.

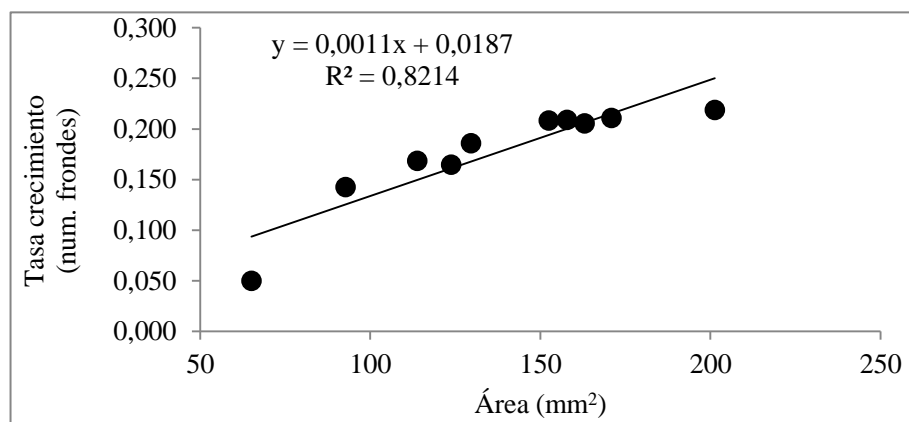


Figura 25. Relación entre tasa de crecimiento relativa y área foliar de *Lemna gibba* para todas las concentraciones de Cd estudiadas.

Eje longitudinal

Al analizar el eje longitudinal total, se observó que el valor del eje longitudinal total decreció a medida que incrementó la concentración de exposición (Tabla 35). No se observó una diferencia significativa con respecto a los controles en las plantas expuestas a las cuatro menores concentraciones, mientras que las cinco mayores difirieron significativamente.

Tabla 35. Eje longitudinal total de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd y control. Media de tres réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Cd/L	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
Media	119	104	110	107	111	95*	75*	76*	61*	38*
D.E.	13.8	4	6.2	2.3	2.3	5.2	1.5	3.2	5.1	5
C.V.	0.11	0.03	0.05	0.02	0.02	0.05	0.02	0.04	0.08	0.13

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett (p<0.05)

Se calculó además, el valor promedio del eje longitudinal de las distintas frondes (Tabla 36). No se observaron en este caso variaciones estadísticamente significativas en los distintos tratados con respecto al control.

Tabla 36. Valor promedio del eje longitudinal de las frondes (mm^2) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Cd/L	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
Media	2.15	2.24	2.19	2.09	1.96	1.89	1.93	2.02	1.87	2.26
D.E.	0.06	0.08	0.28	0.02	0.04	0.14	0.03	0.01	0.04	0.3
C.V.	0.02	0.03	0.12	0.01	0.02	0.07	0.01	0.00	0.02	0.13

Eje transversal

En cuanto al análisis del eje transversal total de las plantas expuestas 7 días a distintas concentraciones de Cd, se observó que hubo un efecto significativo en las dos concentraciones más bajas (Tabla 37). Por su parte en las plantas expuestas a las dos siguientes concentraciones (0.52 y 1.03 mg/L) se vio una reducción del efecto sobre dicha variable ya que los valores se acercaron al del control y no mostraron una inhibición significativa. A partir de la concentración 2.06 mg/L se observó una reducción del valor del eje transversal total de las plantas a medida que incrementó el contenido de metal disuelto. Dicha inhibición fue significativa en las cinco mayores concentraciones.

Tabla 37. Eje transversal total de las frondes (mm^2) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd y control. Media de tres réplicas. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Cd/L	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
Media	104	84.8*	85.8*	86.2	92.4	76.78*	59.9*	59.4*	46.9*	28.7*
D.E.	12	8.09	3.42	3.48	0.75	4.49	0.39	2.30	3.90	3.91
C.V.	0.11	0.09	0.03	0.04	0.01	0.05	0.01	0.03	0.08	0.13

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Se calculó además, el valor promedio del eje transversal de las distintas frondes. En este caso se observó un decrecimiento de este valor a medida que se incrementó la

concentración de Cd en el medio hasta la concentración de 16.5 mg/L (Tabla 38). Entre las concentraciones 2.06 y 16.5 mg/L inclusive las diferencias con los controles fueron significativas. En la mayor concentración, las plantas mostraron un incremento en el valor de este promedio con respecto a las concentraciones anteriores. Esto puede deberse a que en este tratamiento las plantas presentaron un crecimiento muy inhibido de manera que los inóculos iniciales permanecieron prácticamente igual en tamaño y número, sin dar lugar a una variación importante en este promedio. Cabe destacar, aunque se detallará más adelante, que estas plantas mostraron un alto nivel de clorosis con un aspecto prácticamente blanquecino en la totalidad de su superficie.

Tabla 38. Valor promedio del eje transversal de las frondes (mm²) de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd y control. D.E. (desvío estándar); C.V. (coeficiente de variación).

mg Cd/L	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
Media	1.87	1.82	1.71	1.67	1.62	1.53*	1.54*	1.56*	1.44*	1.69
D.E.	0.07	0.04	0.19	0.04	0.01	0.10	0.07	0.00	0.03	0.23
C.V.	0.03	0.02	0.11	0.02	0.01	0.06	0.04	0.00	0.02	0.13

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Efectos sobre la relación frondes/colonias

El cálculo de la relación frondes/colonias de las plantas expuestas a Cd se muestra en la tabla 39. Esta evaluación de la modificación del número de frondes por colonia mostró una fuerte tendencia de desagregación de las plantas ya que este índice decreció a medida que incrementó la concentración del metal en solución. Todas las concentraciones a excepción de la menor, difirieron significativamente del control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). En concordancia con esto pudo verse al finalizar el ensayo que en la concentración más alta, las colonias estaban formadas únicamente por frondes aisladas, además de la pérdida del color verde.

Tabla 39. Relación frondes/colonias para control y tratados.

Concentración	Nº de frondes	Colonias	Relación Frondes/colonias
Cnt	55.5	12	4.6
0.13	52.5	13.5	3.8
0.26	50.5	16.5	3.1*
0.52	51.5	19.5	2.6*
1.03	52	29	1.8*
2.06	44	31.5	1.4*
4.13	39	29	1.3*
8.26	38	30.5	1.2*
16.5	32.5	29	1.1*
33	17	17	1*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Clorofila “a”, “b” y carotenoides

En cuanto al contenido de pigmentos, se observó una disminución en el contenido de clorofila “a” en todos los tratados (Tabla 40). En este caso, las tres concentraciones más grandes tuvieron una diferencia significativa con el control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). Para el contenido de clorofila “b”, en los tratados se observó una tendencia a presentar valores más elevados respecto de los controles, sin embargo no se encontraron diferencias significativas. La misma tendencia, pero incluso más marcada, pudo observarse para el contenido de carotenoides totales, el cual aumento en la planta a medida que incrementó la concentración del metal en el medio. Para este caso, no obstante, tampoco pudo observarse diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 40. Concentración de clorofila “a”, “b” y carotenoides totales (mg/g peso fresco).

	Tratamientos (mg Cd/L)									
	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06	4.13	8.26	16.5	33
Clorofila “a”	363 (39)	355 (8.5)	333 (15)	270 (42)	256 (2.3)	220 (38)	188* (41)	190* (34)	184* (45)	144* (31)
Clorofila “b”	117 (13)	134 (4)	132 (4.7)	116 (21)	111 (6)	132 (53)	122 (53)	134 (43)	150 (40)	129 (28)
Carotenoides	163 (29)	167 (1.9)	179 (25)	172 (34)	198 (9.7)	239 (46)	224 (38)	269 (49)	232 (51)	248 (34)

() Desvío estándar

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y las expuestas a las 5 concentraciones más bajas de los ensayos de crecimiento. El contenido proteico decreció a medida que incremento la concentración de metal en solución. Se observó una diferencia significativa respecto al control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$) a la mayor concentración evaluada (2.06 mg/L) donde las plantas mostraron un 42% de inhibición respecto del control (Tabla 41).

Tabla 41. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (mg Cd/L)					
	Cnt	0.13	0.26	0.52	1.03	2.06
Proteínas (mg/ml)	2.75	2.44	2.65	1.83	1.72	1.57*
	(0.58)	(0.72)	(0.19)	(0.49)	(0.58)	(0.03)

() Desvío estándar

*Efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes**Efectos sobre la actividad de CAT*

La actividad de la enzima antioxidante CAT en las plantas expuestas a Cd no varió significativamente respecto al control para ninguna de las concentraciones evaluadas (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$) (Figura 26). Sin embargo se observó una pequeña disminución de dicha actividad en todas las concentraciones. Esta inhibición, sobre todo en la mayor concentración evaluada (2.06 mg/L), es probable que se deba a una producción en exceso de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante la inactivación del grupo hemo unido a la enzima (Parlak y Yilmaz 2013; 2012). Esta enzima fue la menos activa en todas las concentraciones evaluadas, incluso en los controles.

Efectos sobre la actividad de APOX

La actividad de la enzima antioxidante APOX mostró una tendencia positiva de su actividad al incrementar la concentración presente en el medio de cultivo (Figura 26). Las dos concentraciones menos incrementadas en dicha actividad fueron las dos menores (0.13 y 0.26 mg/L). La siguiente concentración (0.52 mg/L) no difirió significativamente del control aunque presentó un 77% de incremento de la actividad respecto del control. Las dos

mayores concentraciones (1.03 y 2.06 mg/L), mostraron diferencias significativas con el control, presentando un incremento de la actividad del 115 y 142 % respectivamente.

Efectos sobre la actividad de GPOX

La enzima antioxidante GPOX, también mostró una tendencia positiva de su actividad al incrementar la concentración presente en el medio de cultivo (Figura 26). El único tratamiento que no presentó diferencias significativas respecto al control fue la menor concentración de Cd en el medio (0.13 mg/L), mientras que las plantas expuestas a las cuatro mayores concentraciones mostraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima con respecto al control. Las dos mayores concentraciones (1.03 y 2.06 mg/L) fueron las de mayor incremento en la actividad con un 732 y 735 % más de actividad que el control. Esta enzima fue la que presentó la mayor actividad en todos los tratados incluso en el control.

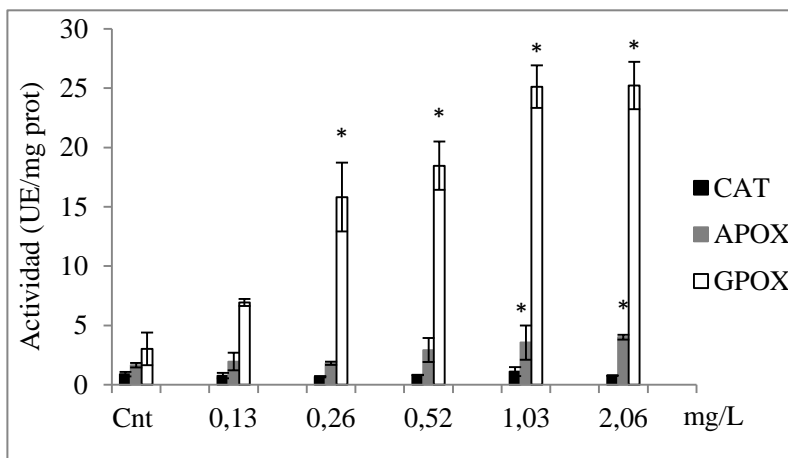


Figura 26. Actividad de CAT APOX y GPOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Cd. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Evaluación macroscópica de los ejemplares de L. gibba

Al finalizar los ensayos de exposición al Cd también se llevó a cabo una evaluación macroscópica con el fin de observar y remarcar las características significativas que más se

vieron afectadas que pudieran ser observadas a simple vista. Para este metal, ya se ha mencionado lo referido a la tendencia de desintegración de las colonias, donde se observó una disminución notoria en la cantidad de colonias de tres o más frondes desde la concentración 2.06 mg Cd/L y la presencia únicamente de colonias de frondes aislados en la mayor concentración de exposición. A partir de la concentración de 2.06 mg/L, empezó a hacerse presente una importante cantidad de frondes con clorosis y una disminución general del color verde intenso. También a partir de esta concentración la gibosidad de algunas frondes empezó a verse afectada. La longitud de las raíces se vio bastante afectada incluso en las concentraciones bajas. Una posible razón de este efecto podría deberse a un desbalance de óxido nítrico (NO), ya que se ha establecido que esta molécula actúa como mensajero en las plantas debido a su relativa estabilidad y facilidad para traspasar las membranas biológicas (Griffiths 2005), la cual en respuesta al Cd puede actuar como una molécula deletérea que media en los efectos tóxicos del Cd como por ejemplo en la inhibición del crecimiento de las raíces como fue observado en *Arabidopsis* (Besson-Bard et al. 2009) y en trigo (Groppa et al. 2008), efecto que fue revertido al agregar carboxi-PTIO que reacciona con el NO y lo remueve. En la figura 27 se muestran las plantas luego del período de 7 días de exposición para control, así como una concentración intermedia (2.06 mg/L) y la mayor (33 mg/L).

Las plantas absorben nitrógeno, uno de los macronutrientes esenciales, en forma de nitrato o de amonio. El medio de cultivo utilizado en este trabajo (AAP 20X) aporta nitrógeno principalmente en forma de nitrato, y es sabido que el Cd tiene un efecto inhibitorio en la asimilación de éste (Gallego et al. 2012). La disminución del contenido de clorofilas observada en los distintos tratamientos con Cd podría deberse a un déficit nutricional de nitrógeno, el cual es un componente importante en el anillo de porfirina constituyente de estos pigmentos. La pérdida de pigmentación observada también podría explicarse por la alta movilidad del Cd en el floema, por lo que este metal podría acumularse en cualquier parte de la planta causando crecimiento reducido y clorosis (Gallego et al. 2012). Además se ha dicho que este metal altera la ultraestructura de los cloroplastos y reduce la tasa neta fotosintética (Souza et al. 2011).

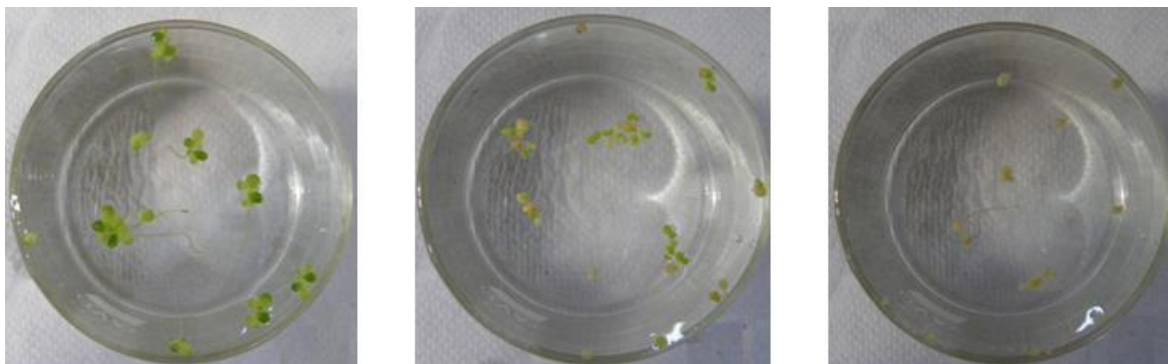


Figura 27. Plantas de *Lemna gibba* al cabo de los 7 días de exposición para control (izquierda), 2.06 mg/L (centro) y 33 mg/L (derecha).

Estimación de Índices de toxicidad

Con el fin de analizar la toxicidad de la exposición de *Lemna gibba* a distintas concentraciones de Cd durante 7 días, distintos índices fueron calculados basándose en número de frondes, peso fresco y área total (Tabla 42).

Tabla 42. Índices de toxicidad (mg/L) a los 7 días de exposición de *Lemna gibba* al Cd. Entre paréntesis se indican los límites de los intervalos de confianza del 95 %.

	Número frondes	Peso fresco	Área total
EC50 7-días	17.8 (14.8-22.3)	1.08 (0.81-1.56)	10.9 (10.19-11.78)
CENO	1.03	0.13	0.13
CME0	2.06	0.26	0.26

Por otra parte, al igual que para los otros metales individuales, se evaluó la sensibilidad de las distintas variables de medida de las plantas expuestas al Cd. Para ello se calcularon los índices de la concentración efectiva 50 (CE50) (Tabla 42). Este índice para el Cd resultó tener el valor más bajo cuando se calculó en base al peso fresco (1.08 mg/L); el área total presentó un valor de CE50 de 10.9 mg/L, mientras que la calculada según el número de frondes resultó ser de 17.8 mg/L (Tabla 42). Megateli et al (2009) informó una inhibición de crecimiento del 83% para *Lemna gibba* expuesta a 0.1 mg Cd/L luego de 10 días de exposición basándose en conteo del número de colonias, utilizando un medio de cultivo diferente y a un pH de 6.5. Halaimi et al. (2014) por su parte, basándose en el número de

frondes, observó una inhibición del crecimiento del 81% luego de 6 días de exposición para la misma especie con 1 mg Cd/L. Además para la especie *L. minor*, trabajando en un medio de cultivo diferente y a un pH de 5.5, Drost et al. (2007) reportó un CE50, luego de 7 días de exposición, de 0.2 mg Cd/L al basarse en el número de frondes.

Los índices CENO y CMEO resultaron ser menores considerando el área total y el peso seco que los estimados en base al número de frondes. El peso seco fue la variable que arrojó valores menores de todos los índices estimados.

Comparación de los índices de toxicidad

Se observó una respuesta dependiente de la concentración del estrés inducido por los tres metales al evaluarse el número de frondes, el peso fresco y el área total, aunque se evidencio una sensibilidad distinta por parte de estos parámetros. En el caso de Ni, el área total resultó ser el parámetro más sensible, mientras que fue el peso fresco para el caso del Cd. Para el Zn por su parte, los parámetros más sensibles fueron el número de frondes y peso fresco, mientras que el área total fue el menos sensible.

Los resultados señalan que al basar el análisis sobre las efectivas 50 para el número de frondes, que es el parámetro principal según el protocolo de la OECD (2006), el Ni resultó ser el metal con mayor efecto tóxico. Esto mismo es observado al basarse en el parámetro del área total. Por su parte, al tener en cuenta los resultados de crecimiento del peso fresco, fue el Cd el que resultó más tóxico ($EC_{50} = 1.08$ mg Cd/L). Este valor es el más bajo encontrado entre todas las efectivas 50 calculadas, indicando un elevado efecto tóxico por parte del Cd en el crecimiento y desarrollo normal de la especie *L. gibba*. El Zn presentó en todos los casos una menor toxicidad para *Lemna gibba* en la condiciones utilizadas (Tabla 43) En Megateli et al (2009) se compararon también las toxicidades del Cd y Zn sobre *Lemna gibba*, resultando más tóxico el primero cuando el parámetro de crecimiento evaluado fue el número de colonias (Megateli et al. 2009). Mientras que Drost et al. (2007), trabajando con la especie *Lemna minor*, informó que el Cd fue más toxico que el Ni y este más que el Zn al tener en cuenta el número de frondes.

Tabla 43. Valores expresados en mg/L de las concentraciones efectivas 50 (EC50) para los tres metales individuales calculados en base a las distintas variables de respuesta.

	Cd	Ni	Zn
Numero frondes	17.8	2.54	76.73
Peso fresco	1.08	3.89	76.93
Área total	10.9	2.39	137

6.1.1.4 Análisis integrado de los parámetros evaluados

Los ensayos realizados permitieron evidenciar un efecto fitotóxico por parte de los tres metales evaluados individualmente (Ni, Zn y Cd), manifestado por una inhibición del crecimiento cuando se analizó en base las distintas variables de medida (número de frondes, peso fresco y área total). La respuesta tóxica de *L. gibba* a la exposición de los metales fue evidenciada como un aumento en la inhibición del crecimiento a medida que se incrementó la concentración de exposición. En este sentido, se ha mencionado que la toxicidad por parte de metales puede deberse principalmente por tres razones: interacción directa con proteínas debido a la afinidad por los grupos tiol, histidilo y carboxilo, causando que los metales interactúen afectando sitios estructurales, catalíticos y de transporte en la célula; también por la estimulación de la generación de especies reactivas del oxígeno provocando estrés oxidativo; y por desplazamiento de cationes esenciales de sitios de unión específicos causando el colapso de las funciones (Sharma y Dietz 2009). Por otra parte se ha dicho que los metales pesados tienden a unirse a los grupos sulfidrilos de distintas enzimas y de esta manera suprimiendo el funcionamiento de componentes biológicos esenciales, lo cual se evidencia en la toxicidad observada; mientras que además pueden provocar un desbalance iónico como resultado de una translocación alterada de iones como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} (Yilmaz y Parlak 2011). La toxicidad observada en la especie utilizada puede deberse a especies reactivas del oxígeno (EROs) que pueden ser producidas por estrés con metales. Dicha toxicidad podría ser causada por una proteólisis desmedida que ha sido asociada al estrés oxidativo promovido por EROs (Palma et al. 2002). También, se ha reconocido últimamente que los EROs en las plantas realizan funciones esenciales en diversos procesos como el crecimiento, desarrollo aclimatación al ambiente y establecimiento de resistencia ante patógenos (Mullineaux et al. 2008). Un desbalance en la producción o regulación de estas especies químicas es factible que conlleve a trastornos en los procesos recién

mencionados. Al representar hasta más del 50% del peso seco de las células, las proteínas son biomoléculas con muchas posibilidades de reaccionar con estos EROs, de manera que pueden sufrir daño oxidativo (Pena et al. 2012). Se ha mencionado en este sentido que los aminoácidos más susceptibles de ser atacados por oxidantes son aquellos capaces de deslocalizar carga, como aquellos que contienen cadenas laterales aromáticas, cíclicas o con tioles donde el sulfuro incrementa su valencia para estabilizar el radical intermedio; y aunque los aminoácidos principales de sufrir oxidación mediante la reacción con radicales parecen ser triptófano, tirosina, metionina, histidina, cisteína y el dímero cistina, incluso hasta los aminoácidos menos reactivos son capaces de reaccionar frente a algunos radicales como el hidroxilo, resultando en una oxidación de la mayoría de sus cadenas laterales (Griffiths 2005). Entre los efectos de oxidación de las proteínas causados por radicales puede ocurrir frecuentemente la introducción de nuevos grupos funcionales en las cadenas laterales de los aminoácidos como adición de hidroxilos o carbonilos por abstracción de hidrógenos, esto contribuye en la alteración de las funciones y el recambio de las mismas, además luego de un ataque oxidativo pueden formarse oxoácidos y aldehídos (Griffiths 2005; Pena et al. 2012). Como se ha mencionado previamente en el presente trabajo para el caso del Cd, distintos factores de estrés abiótico son causantes de cierre estomático provocando una limitación en el suministro de CO₂ para la fotosíntesis. Bajo estas condiciones, los cloroplastos pueden volverse una fuente principal de EROs por un lado por fotorespiración mediante el proceso de reciclado de fosfoglicolato formado por la reacción de oxigenación de la Rubisco, la cual lleva a una producción sustancial de H₂O₂ por una glicolato oxidasa localizada en el peroxisoma y por otro lado por el proceso que involucra la reacción de Mehler, la cual implica la reducción del oxígeno molecular, hasta superóxido y peróxido de hidrógeno, por los electrones de la cadena de transporte electrónico fotosintético en el fotosistema I (Mullineaux et al. 2008). Las inhibiciones en las tasas de crecimiento observadas bajo el estrés por los metales evaluados en el presente trabajo podría estar explicado también por lo observado por Pena et al. (2012) donde trabajaron con Cd²⁺ y H₂O₂ en trigo y donde sugieren que el estrés primero bloquea rápidamente la progresión del ciclo celular, presumiblemente para prevenir que las células entren en estadios donde son particularmente vulnerables al daño, y permite que el sistema de defensa celular se mantenga activado. Dicho bloqueo decrecería la proliferación celular mediante la

regulación negativa de estimuladores de la división celular, como una pérdida de funcionalidad de un complejo ciclina D-CDK (Pena et al. 2012).

Se observó también, que para algunas concentraciones se produjo un efecto estimulatorio del crecimiento. En particular, esto ocurrió para las plantas expuestas a las menores concentraciones de Zn y Ni (2.3 and 0.18 mg/L, respectivamente) cuando las evaluaciones estuvieron basadas en número de frondes y peso fresco; con la excepción de una muy leve inhibición del 1.48 % para la plantas expuestas a la menor concentración de Zn al evaluar el peso fresco. Se observó también estimulación al basar el análisis en el área total en las plantas expuestas a la menor concentración de Zn. Por su parte ninguna de las concentraciones de Cd evaluadas en este trabajo presentó dicho efecto. La estimulación del crecimiento, podría explicarse en base al aumento de la biodisponibilidad de estos dos micronutrientes esenciales, lo que ayudaría al correcto funcionamiento de la fisiología cuando estos no alcanzan valores tóxicos. Además un incremento en la actividad observada de las enzimas antioxidantes en dichas concentraciones de Zn y Ni podrían ser suficiente para contrarrestar el poder oxidante inducido por estrés en estos casos.

En el presente estudio, la acción del Cd sobre *L. gibba* no fue tan severa como la reportada en los trabajos mencionados. Las razones de estas diferencias pueden deberse a las condiciones de laboratorio utilizadas en la realización de las evaluaciones, y a diferencias interespecíficas y clones dentro de la misma especie. El rango de acción fue similar a los hallados en trabajos de remoción, como en Kaoud et al. (2011) donde se utilizaron plantas de la especie *L. gibba*, para remover el metal del medio en un medio de cultivo con una concentración de 10 mg Cd/L. También Verma y Suthar (2015) observaron a la misma concentración, una remoción del 61.5 % de la carga inicial de metal por parte de *L. gibba* en medio de cultivo con pH 7 luego de 7 días de exposición y un crecimiento (medido como ganancia de biomasa) de 44.4 % bajo las mismas condiciones.

La acción de todos los metales también pudo evidenciarse en los distintos parámetros morfométricos medidos. Entre estos, el área foliar total resultó el más afectado, ya que se encontraron diferencias significativas entre tratados y controles para todos los casos a excepción de la concentración más baja evaluada de cada metal. Al comparar el área foliar con el número de frondes, se puede observar que se observó inhibición en el área foliar total en la segunda concentración más baja evaluada en el caso de los tres metales, es decir

0.37 mg Ni/L, 4.6 mg Zn/L y 0.26 mg Cd/L, mientras que a estas mismas concentraciones no se observó una inhibición significativa en el número de frondes. En el trabajo de Chaoui et al. 1997 fue planteado que las peroxidases podrían estar involucradas en la lignificación de las paredes celulares como una adaptación mecánica a condiciones de estrés, proceso que afectaría la plasticidad celular limitando la elongación correcta de las células y por lo tanto el crecimiento; en dicho trabajo relacionan una actividad exacerbada de la enzima GPOX con una limitación en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* bajo tratamientos con 0.6 mg Cd/L o 6.5 mg Zn/L. En lineamiento con lo mencionado, podría ser que en el presente trabajo haya ocurrido un efecto similar, dado que en las concentraciones mencionadas donde se observó disminución en el área total pero no en el número de frondes, la actividad de la enzima GPOX fue incrementada con respecto los controles. De esta manera podría suponerse que las frondes hijas pudieron nacer pero se vieron limitadas en el crecimiento posterior. Por otra parte también ha sido mencionado que las propiedades elásticas de las paredes celulares pueden verse afectadas en diferente grado por diferentes metales, donde un incremento de la rigidez de la pared celular puede ser causa de trastornos enzimáticos en la biosíntesis de constituyentes de la pared, cambios en el ensamblaje de los polímeros de la pared, cambios de disposición de los microtubulos o a un aumento de la adhesión celular de la lámina media (Barceló y Poschenrieder 1992).

El Ni fue el metal que más afectó al eje longitudinal total de las plantas ya que una concentración tan baja como 0.92 mg/L mostró diferencias significativas con el control, mientras que fueron necesarios 2.06 mg/L para encontrar diferencias significativas en las plantas expuestas a Cd y 9.2 mg/L para el caso del Zn. En cambio el eje transversal total fue más afectado por el Cd, donde se encontraron diferencias significativas con el control en todas las concentraciones evaluadas, incluso la menor (0.13 mg/L). Para este eje, también fue el Zn el metal del que se necesitó más concentración para que las plantas muestren diferencia significativa con el control (4.6 mg/L). El promedio del área de las frondes fue afectado significativamente por 11.82 mg Ni/L, mientras que para los restantes metales no se encontró diferencia a estas concentraciones. Bajo esta misma concentración, las plantas expuesta a Ni mostraron diferencias también en el promedio del eje longitudinal y transversal. Para el Zn, por su parte, el eje transversal parece haber sido afectado en un poco mayor medida que el eje longitudinal ya que se encontraron diferencias en el

promedio de ambos ejes a 183 y 284 mg/L respectivamente. Algo similar ocurrió para el Cd, donde no se vieron diferencias significativas en el promedio del eje longitudinal bajo ningún tratamiento, pero si para el promedio del eje transversal desde la concentración intermedia de 2.06 mg/L.

Se estudió también la sensibilidad de la variable de medida desintegración de las colonias. Para ello fue calculada la relación frondes/colonias de las plantas para cada metal. Para el Ni, esta variable resultó poco sensible ya que en ninguno de los tratamientos con este metal se observaron diferencias significativas con el control. Para el Zn se observó en las concentraciones más bajas (2.3 a 9.2 mg/L) una tendencia de menor liberación de frondes hijas, es decir colonias con mayor número de frondes que en los controles; aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Para este metal, a concentraciones mayores, esta relación fue significativamente menor que en el control. Esta variable resultó ser más sensible para el Cd, ya que las plantas mostraron diferencias significativas en la relación frondes/colonias desde una concentración baja como 0.26 mg/L. Los trabajos que incluyen mediciones de este parámetro son escasos; Li y Xiong (2004) trabajando con *Lemna paucicostata* expuesta a Cd, encontraron que este metal inducía el desprendimiento temprano de las frondes hijas en un proceso que podría estar desencadenado por una producción de cantidades anormales de etileno en la planta y que el mismo podría ser utilizado como un biomarcador más sensible que otros parámetros.

En cuanto a la evaluación de los pigmentos, se observó que el contenido de clorofila “a” presentó en todos los casos una reducción con respecto a los controles a medida que incrementó la concentración del metal evaluado en cada caso. El contenido de este pigmento fue mayormente afectado por el Ni, cuya concentración más baja en la cual se observó un efecto significativo fue el 9% de la concentración de efecto para el Cd y el 0.5% de la de efecto para el Zn, metal que tuvo el menor efecto sobre la clorofila “a”. Se observó además una tendencia de reducción del contenido del clorofila “b” para Ni y Zn. También en este caso, el Ni fue mayormente afectado que el Zn, con una concentración de efecto del 8.9% de la del Zn. Para el Cd, las plantas de todos los tratamientos mantuvieron concentraciones de este pigmento parecidas al del control. El contenido de carotenoides se vio también afectado negativamente por los tratamientos con Ni y Zn. En este caso, la concentración más baja de Ni que presentó efecto significativo fue el 8% de la que presentó

efecto para el Zn. Las plantas expuestas a Cd, incrementaron levemente su contenido de este pigmento a medida que incrementó la concentración del metal en solución, aunque para ninguno de los tratados las diferencias fueron estadísticamente significativas. Se ha mencionado que la destrucción de los pigmentos fotosintéticos por metales puede deberse a un deterioro en la cadena transportadora de electrones, reemplazo de los iones Mg^{2+} asociados al anillo tetrapirrólico de las moléculas de clorofila, inhibición de enzimas importantes asociadas a la biosíntesis de clorofila o a procesos de peroxidación de los lípidos de la membrana de los cloroplastos por especies reactivas de oxígeno (Radic et al. 2009; Manios et al. 2003).

Por otra parte, en base a los resultados obtenidos se pudo observar la tendencia general de un decrecimiento en el contenido de proteína total para los tres metales. A pesar de esto en ninguno de los casos las diferencias con los controles fueron estadísticamente significativas, con excepción de la mayor concentración de Cd.

En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes, se observó que fue la enzima GPOX, la que ampliamente en todos los casos presentó mayor actividad. La actividad de la enzima APOX también fue estimulada, incluso significativamente en varios de los tratamientos llevados a cabo con los tres metales, aunque en ningún caso llegó a igualar la actividad de la GPOX. Asimismo se observó que CAT fue la de menor actividad y en general la que menos incrementó en los distintos tratados. Doğanlar (2013), observó similares resultados de la acción del Cd también trabajando con la especie *Lemna gibba*, reportando que la actividad de la CAT no se vio afectada; mientras que hubo un incremento de la actividad de APOX y GPOX. Este comportamiento podría explicarse considerando las afinidades de las enzimas por el sustrato H_2O_2 . En este sentido, por ejemplo ha sido dicho que la ascorbato peroxidasa tiene mucho más afinidad que la catalasa (Gomes-Junior et al. 2006a). Por otro lado, APOX está presente en mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y citosol, mientras que CAT esta principalmente localizada solo en los peroxisomas; mostrando escasa o nula actividad en los demás compartimentos celulares (Mizuno et al. 1998). Esto también ha sido mencionado por Asada (1992), donde se expone que APOX tiene más afinidad por H_2O_2 que la CAT, lo que permite que esta primera enzima pueda reaccionar con pequeñas cantidades del sustrato y en localizaciones más específicas por los lugares donde se encuentra. Esta podría ser la razón por la cual en todos los casos observados en el presente

trabajo la actividad de la APOX es mayor que la de la CAT. Por su parte la GPOX también presenta una afinidad mayor que la CAT y está presente principalmente en vacuolas, pared celular, citosol y también en espacios extracelulares (Shahid et al. 2014). El hecho de que las enzimas antioxidantes posean diferentes localizaciones y propiedades químicas, hace que el sistema antioxidante sea más flexible y versátil para controlar a un nivel adecuado los niveles de EROs. Así, se produce un balance en las enzimas que eliminan o transforman estas especies reactivas; como por ejemplo en algunos casos donde se determinó que los niveles de la actividad de CAT se reducen cuando se incentivan los de APOX y GPOX (Caverzan et al. 2012, Sofo et al. 2015). Algo similar fue observado en el presente estudio, donde CAT fue la que menos actividad presentó en todos los casos. Por su parte ha sido expuesto que la actividad de las enzimas antioxidantes en plantas con estrés por metales es altamente variable, dependiendo de la especie, de ion metálico, de la concentración y duración de la exposición, pero dichos procesos reflejan el estado redox modificado de células estresadas (Parlak y Yilmaz 2013; Sharma and Dietz 2009). En consonancia con los resultados del presente trabajo, en Parlak y Yilmaz (2013) se demostró que la actividad de la CAT decreció en tratados entre 0.05 y 20 mg Cd/L respecto al control. Como ejemplo de la variabilidad mencionada entre las especies, se puede mencionar el trabajo de Boscolo et al. (2003) donde reportaron que no hubo cambios en la actividad de la CAT en plantas de maíz expuestas a Al, mientras que se observó una declinación en la actividad en soja y arroz, y un incremento en tabaco y trigo. Por su parte Parlak y Yilmaz (2012) observaron diferencias significativas en la actividad de la CAT en controles de especies relacionadas como *Lemna gibba*, *Lemna minor* y *Spirodela polyrhiza*.

La actividad incrementada de las enzimas antioxidantes (como las evaluadas en el presente trabajo) en una planta, es indicativa de la formación de especies reactivas del oxígeno y por lo tanto de la generación de estrés oxidativo en ellas (Jung et al. 2000). Estos antioxidante celulares, juegan un rol significativo proporcionando resistencia a las plantas mediante la protección de macromoléculas lábiles contra el ataque de radicales libres producidos bajo el estrés por metales pesados (Devi y Prasad 1998). En el presente trabajo, se observó en general un incremento en la actividad enzimática de CAT, APOX y GPOX en las concentraciones y condiciones evaluadas, que indicarían la capacidad de *L. gibba* de

adaptarse a la toxicidad del Ni, Zn y Cd mediante el desarrollo de un sistema de defensa antioxidante.

6.1.2 Evaluación de mezclas binarias de metales

En las experiencias realizadas con el fin de estudiar la acción de mezclas binarias de los metales estudiados, se evaluaron efectos sobre el crecimiento y sobre biomarcadores. Los efectos sobre el crecimiento incluyeron la determinación del número de frondes y peso fresco, a partir de los cuales se estimaron distintas variables de respuesta como: tasa de crecimiento específica (μ), porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento específica (% Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (% Iy) y porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (% Inh). También se evaluó el grado de desagregación de las colonias, mediante el cálculo de la Relación frondes/colonias. Los biomarcadores estudiados, incluyeron la actividad de las enzimas vinculadas al estrés oxidativo, Catalasas (CAT), Ascorbato Peroxidasa (APOX) y Guayacol Peroxidasa (GPOX).

Como fue explicado en Materiales y Métodos, se evaluaron tres relaciones de las mezclas binarias de Ni/Zn, Cd/Zn y Cd/Ni, consistiendo cada relación en cinco combinaciones de concentraciones de los metales. Las relaciones evaluadas fueron:

Relación 1 = 0.67:0.33

Relación 2 = 0.5:0.5

Relación 3 = 0.33:0.67

A continuación se describen los resultados obtenidos de las experiencias realizadas con distintas proporciones de las mezclas binarias de Ni/Zn, Cd/Zn y Cd/Ni y las diferentes combinaciones de concentraciones de cada metal en la mezcla respectiva.

6.1.2.1 Efectos de las diferentes proporciones de la mezcla Ni/Zn sobre el crecimiento y biomarcadores

Efectos de la Relación 1 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 44. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 1 de la mezcla Ni/Zn y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Ni (mg/L)	Concentración Zn (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.67	0.33	
6.15	101.21	107.36
3.08	50.6	53.68
1.54	25.30	26,84
0.77	12.65	13.42
0.38	6.32	6.7

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas con este en todos los casos (Tabla 45). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 18 y 88 % que resultaron significativas en todos los casos (Tabla 45). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa para todas las concentraciones y mostró un máximo de inhibición del 95% (Tabla 45). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 25 y 75 % siendo también significativa para las cinco combinaciones evaluadas (Tabla 45).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control, aunque no se vio tan afectada como para el caso del número de frondes, siendo las 3 mayores concentraciones inhibidas significativamente (Tabla 46). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 19.63 a 66.88 %, siendo significativa en todos los casos (Tabla 46). Por su parte la inhibición de la productividad (% Iy) llegó a un máximo del 80.55% y fue significativa en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 46). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 25.06 y 62.02 %, siendo este máximo de inhibición menor que para el caso de número de frondes (75.42%), por lo tanto mostrando menor sensibilidad, aunque siendo en este caso también significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 46).

Tabla 45. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 1 de la mezcla Ni/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.227 (0.003)	-	-	-
6.7	0.185* (0.018)	18.67* (8.09)	31.91* (12)	25.42* (9.5)
13.42	0.192* (0.004)	15.64* (1.9)	27.66* (3.01)	22.03* (2.3)
26,84	0.121* (0.014)	46.95* (6.3)	65.96* (6.01)	52.54* (4.7)
53.68	0.099* (0.017)	56.69* (7.4)	74.47* (6.02)	59.32* (4.7)
107.36	0.027* (0.007)	88.15* (3.1)	94.68* (1.5)	75.42* (1.2)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 46. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Inh) considerando el peso fresco de la Relación 1 de la mezcla Ni/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.210 (0.006)	-	-	-
6.7	0.169 (0.005)	19.63 (2.53)	32.55* (3.61)	25.06* (2.78)
13.42	0.170 (0.007)	18.94 (3.51)	31.53* (5.07)	24.27* (3.90)
26,84	0.107* (0.013)	48.78* (6.37)	66.33* (5.93)	51.06* (4.56)
53.68	0.095* (0.011)	54.68* (5.25)	71.65* (4.48)	55.16* (3.45)
107.36	0.070* (0.035)	66.88* (16.54)	80.55* (11.8)	62.02* (9.13)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la Relación 1 de la mezcla Ni/Zn, se pudo evidenciar que para la tasa de crecimiento, el parámetro de medición número de frondes resultó más sensible que el peso fresco ya que si bien en todos los casos las tasas de los tratamiento resultaron menores que los controles, en el primer caso se observó una inhibición mucho mayor y significativa en las cinco concentraciones, mientras que para peso fresco solo las tres mayores combinaciones tuvieron tasas inhibidas significativamente. Al analizar el porcentaje de inhibición del rendimiento (% Iy) y el porcentaje de inhibición (%Inh) se observó que para las cuatro menores sumas de concentraciones las respuestas fueron inhibiciones similares tanto para número de frondes como para peso fresco, mientras que a la mayor concentración (107.36 mg/L) fue mayor la inhibición observada para número de frondes.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Se observó para esta relación que el número de frondes fue significativamente inhibido en todas las concentraciones, mientras que el número de colonias no difirió significativamente con el control en ningún caso, aunque en general presentó valores menores (Tabla 47). Además, la proporción frondes/colonias fue apenas mayor en las 3 menores concentraciones, sin ser estadísticamente significativa (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$) en ninguno de estos casos. Por otro lado, las dos más grandes este valor disminuye notablemente, mostrando diferencias significativas en ambos casos. Se observó por lo tanto, en este análisis de desintegración de las colonias, que las mayores concentraciones afectan la liberación de las frondes hijas; observándose una tendencia a la presencia de colonias con menos frondes (Tabla 47).

Tabla 47. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 1 de la mezcla Ni/Zn.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	59	15.5	3.8
6.7	44*	11	4.0
13.42	46*	10	4.6
26,84	28*	7*	4.0
53.68	24*	15	1.6*
107.36	14.5*	12	1.2*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Ni y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 6.7, 13.42 y 26.8 mg/L (Tabla 48). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control. En este caso las plantas expuestas a 6.7 mg/L se observó una inhibición del 8.5%, la cual no resultó estadísticamente significativa (test de Student $p > 0.05$) (Tabla 48). Se observó una inhibición del 6.6% en la concentración de 13.42 mg/L, tampoco siendo esta

significativa. Por su parte se observó en la mayor concentración una disminución significativa respecto al control con un 30% de inhibición.

Tabla 48. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Ni y Zn)			
	Cnt	6.7	13.42	26.84
Proteínas (mg/ml)	5.26 (0.10)	4.81 (0.30)	4.91 (0.52)	3.72* (0.09)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p < 0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Ni y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 6.7, 13.42 y 26.8 mg/L (Figura 28). En los controles la actividad de la GPOX fue mucho mayor que la de las otras enzimas, y se observó para esta que las plantas expuestas a 6.7 y 13.42 mg/L mostraron una actividad inhibida significativamente mientras que a la máxima concentración la actividad se vio levemente incrementada respecto del control aunque sin ser estadísticamente significativa (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$). Las otras dos enzimas antioxidantes evaluadas, la CAT y APOX, mostraron un comportamiento similar incrementando su actividad en la concentración más baja (6.7 mg/L) aunque no significativamente, mientras que a las dos mayores concentraciones la actividad de estas enzimas resultó significativamente menor respecto a los controles (Figura 28).

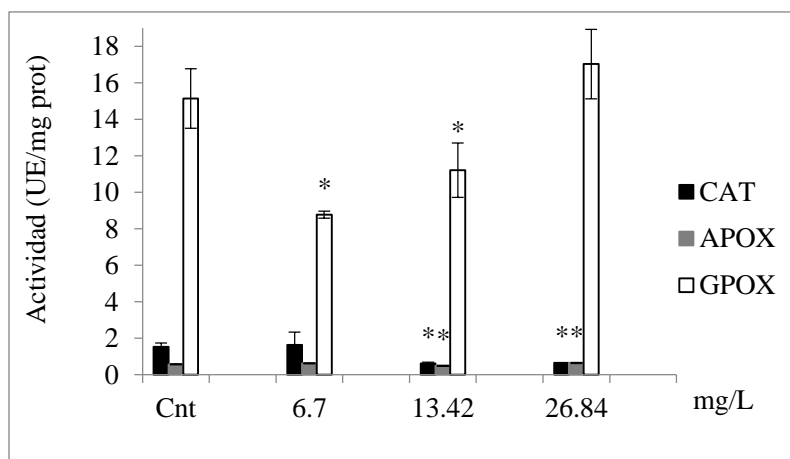


Figura 28. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas en la mezcla 0.67 Ni-0.33 Zn. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Efectos de la Relación 2 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 49. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 2 de la mezcla Ni/Zn y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Ni (mg/L)	Concentración Zn (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.5	0.5	
4.62	151.8	156.42
2.31	75.9	78.21
1.15	37.96	39.11
0.58	18.97	19.55
0.29	9.49	9.78

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas con este en todos los casos (Tabla 50). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango de

porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 19.16 y 100 % que resultaron significativas en todos los casos (Tabla 50). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa para todas las concentraciones y mostró un máximo de inhibición del 100% (Tabla 50). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 26.27 y 100 % siendo también significativa para las cinco combinaciones evaluadas (Tabla 50).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control, siendo todas las concentraciones inhibidas significativamente respecto al control con excepción de la menor (9.78 mg/L) (Tabla 51). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 14.19 a 90.85 %, siendo significativo para las cuatro mayores concentraciones (Tabla 51). Por su parte la inhibición de la productividad (% Iy) llegó a un máximo del 95.70% y fue significativa en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 51). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 18.75 y 73.68 %, siendo también en este caso inhibida significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 51).

Tabla 50. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 2 de la mezcla Ni/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.227 (0.003)	-	-	-
9.78	0.184* (0.007)	19.16* (3.01)	32.97* (4.51)	26.27* (3.59)
19.55	0.126* (0.007)	44.62* (3.06)	63.83* (3)	50.84* (2.39)
39.11	0.080* (0.010)	64.93* (4.23)	80.85* (3)	64.40* (2.39)
78.21	0.057* (0.023)	74.92* (9.90)	87.23* (6.01)	69.49* (4.79)
156.42	0.000* (0.000)	100* (0.00)	100* (0.00)	79.66* (0.00)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 51. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el peso fresco de la Relación 2 de la mezcla Ni/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.210 (0.006)	-	-	-
9.78	0.180 (0.010)	14.19 (4)	24.36* (7.09)	18.75* (5.46)
19.55	0.108* (0.012)	48.41* (5.56)	66.02* (5.21)	50.83* (4.01)
39.11	0.104* (0.005)	50.42* (2.38)	67.96* (2.17)	52.32* (1.67)
78.21	0.019* (0.00)	90.85* (0)	95.70* (0)	73.68* (0)
156.42	0.030* (0.006)	85.75* (17.15)	93.04* (18.60)	71.63* (14.32)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la Relación 2 de la mezcla Ni/Zn, se pudo evidenciar que para la tasa de crecimiento, el parámetro de medición número de frondes resultó más sensible que el peso fresco. Para el número de frondes se observó una inhibición mayor de la tasa de crecimiento que para peso fresco, la cual fue significativa en todas las concentraciones y llegó a un máximo de 100%. En concordancia, al analizar el %Iy y el %Ihb, también se evidencia que el número de frondes fue más sensible, llegando a porcentajes de inhibición más elevados que para peso fresco. Entre estas dos variables de respuesta calculadas, para %Iy se observaron porcentajes de inhibición más elevados que para %Ihb para ambas variables de medición.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Para esta relación, se observó que el número de frondes fue significativamente inhibido en todas las concentraciones, mientras que el número de colonias también resultó

significativamente menor para todas las concentraciones a excepción de la segunda más grande (Tabla 52). Por su parte, la proporción frondes/colonias aumentó en la concentración más baja evaluada aunque sin resultar estadísticamente significativo (ANOVA y test de Dunnett $p>0.05$) (Tabla 52). El valor de esta relación fue menor en las demás concentraciones, siendo muy afectado en las dos mayores combinaciones de concentraciones (sumas 78.21 y 156.42 mg/L) (Tabla 52). Esto es concordante con la observación de la escasa o nula presencia de colonias con más de dos frondes en las concentraciones mayores al finalizar el ensayo.

Tabla 52. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 2 de la mezcla Ni/Zn.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	59	15.5	3.8
9.78	43.5*	10.5*	4.14
19.55	29*	11.5*	2.52*
39.11	21*	6.5*	3.23
78.21	18*	14.5	1.24*
156.42	12*	10*	1.20*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p<0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Ni y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 9.78, 19.55 y 39.11 mg/L (Tabla 53). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control con diferencias significativas (test de Student $p<0.05$).

Tabla 53. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Ni y Zn)			
	Cnt	9.78	19.55	39.11
Proteínas (mg/ml)	5.26 (0.10)	0.94* (0.24)	4.45* (0.19)	3.65* (0.16)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p<0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Ni y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 9.78, 19.55 y 39.11 mg/L (Figura 29). En los controles la actividad de la GPOX fue mucho mayor que la de las otras enzimas, y se observó para esta que las plantas expuestas a las tres concentraciones presentaron valores incrementados de actividad respecto al control, aunque siendo solo significativa para la suma 9.78 mg/L (Figura 29). Las otras dos enzimas, CAT y APOX, mostraron un comportamiento similar. La actividad de ambas enzimas fue incrementada significativamente respecto al control para la menor combinación de concentraciones (suma 9.78 mg/L), mientras que las actividades de las dos enzimas resultó menor que el control para las dos mayores concentraciones, siendo esta significativa solo para CAT (Figura 29).

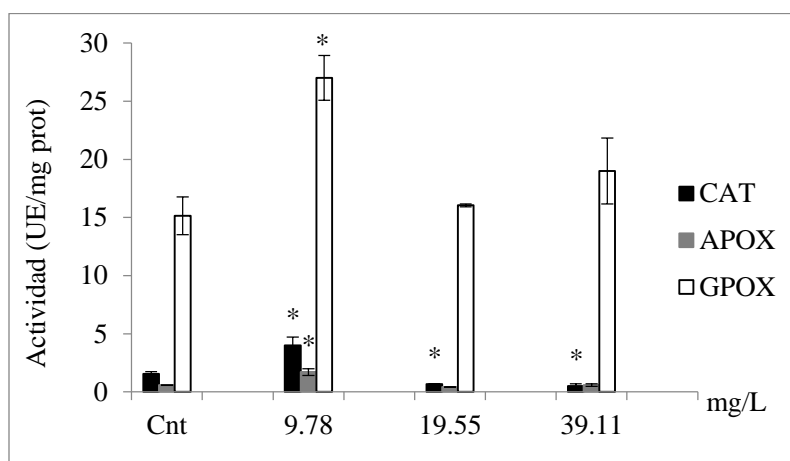


Figura 29. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a en la mezcla 0.5 Ni-0.5 Zn. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Efectos de la Relación 3 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 54. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 3 de la mezcla Ni/Zn y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Ni (mg/L)	Concentración Zn (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.33	0.67	
3.05	203.42	206.47
1.52	101.71	103.23
0.76	50.85	51.61
0.38	25.43	25.81
0.19	12.71	12.9

Las tasas de crecimiento (μ) estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas con este en todos los casos (Tabla 55). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 31.03 y 56.92 % que resultaron significativas en todos los casos (Tabla 55). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa para todas las concentraciones y mostró un máximo de inhibición del 100% (Tabla 55). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 32.95 y 72.73 % siendo también significativa para las cinco combinaciones evaluadas (Tabla 55).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron significativamente menores que el control (Tabla 56). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 38.05 a 100 %, siendo significativo en todos los casos (Tabla 56). Por su parte la inhibición de la productividad (% Iy) también llegó a un máximo del 100% y fue significativa en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 56). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 34.57 y 73.74 %, siendo en este caso también significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 56).

Tabla 55. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 3 de la mezcla Ni/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.186 (0.005)	-	-	-
12.9	0.128* (0.017)	31.03* (9.24)	45.31* (11.05)	32.95* (8.03)
25.81	0.109* (0.031)	41.40* (16.88)	56.25* (17.68)	40.91* (12.85)
51.61	0.115* (0.015)	37.79* (8.07)	53.13* (8.84)	38.64* (6.42)
103.23	0.080* (0.00)	56.92* (0.00)	71.88* (0.00)	52.27* (0.00)
206.47	0.000* (0.00)	100* (0.00)	100* (0.00)	72.73* (0.00)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 56. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el peso fresco de la Relación 3 de la mezcla Ni/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.159 (0.002)	-	-	-
12.9	0.099* (0.005)	38.05* (3.26)	51.42* (3.54)	34.57* (2.38)
25.81	0.064* (0.022)	59.57* (13.53)	71.79* (11.56)	48.26* (7.77)
51.61	0.042* (0.001)	73.37* (0.32)	83.14* (0.23)	55.89* (0.15)
103.23	0.009* (0.001)	94.64* (10.21)	96.83* (5.9)	65.10* (3.96)
206.47	0.000* (0.00)	100* (0.00)	100* (0.00)	73.74* (3.17)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la relación 3 de la mezcla Ni/Zn, se pudo evidenciar que para la tasa de crecimiento, ambos parámetros presentaron una inhibición del 100% en la concentración mayor, mientras que en las demás concentraciones la tasa en base al peso fresco fue siempre un poco más inhibida que para el número de frondes. Esto mismo se observó para el caso del porcentaje de inhibición del rendimiento. En cambio, al comparar la variable de respuesta % Inh, se observó una inhibición similar al comprar número de frondes con peso fresco en todas las concentraciones. Esta variable de respuesta fue la menos sensible en ambos casos ya que la inhibición máxima fue cercana al 73%, mientras que las otras variables presentaron máximos del 100%

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Se observó para esta relación que el número de frondes fue significativamente inhibido en todas las concentraciones, mientras que el número de colonias no difirió significativamente con el control en ningún caso, aunque en general presentó valores menores (Tabla 57). Las plantas expuestas a las cinco combinaciones de concentraciones presentaron una relación frondes/colonias significativamente inhibida con respecto al control (Tabla 57). Se evidencia de esta forma una clara tendencia a la desintegración de las colonias en todos tratados. La gran mayoría de las plantas expuestas a la mayor concentración estaban compuestas por una única fronde.

Tabla 57. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 3 de la mezcla Ni/Zn.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	44	15.5	2.8
12.9	29.5*	14.5	2*
25.81	26*	14.5	1.8*
51.61	27*	17.5	1.5*
103.23	21*	16.5	1.3*
206.47	12*	11.5	1.04*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Ni y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 12.9, 25.81 y 51.61 mg/L (Tabla 58). En todos los tratados se observó disminución en el contenido de proteínas respecto del control. Las plantas expuestas a la menor concentración evaluada de esta relación (12.9 mg/L) mostraron un contenido proteico reducido en un 31% respecto del control, aunque esta diferencia no resultó significativa (test de Student $p>0.05$). La concentración de 25.81 fue la que mayor inhibición presentó (41%), siendo esta estadísticamente significativa. Por su parte la concentración de 51.61 mg/L mostró un contenido proteico muy similar a la menor, sin ser tampoco significativa.

Tabla 58. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Ni y Zn)			
	Cnt	12.9	25.81	51.61
Proteínas (mg/ml)	1.44 (0.09)	0.99 (0.29)	0.84* (0.10)	0.98 (0.12)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p<0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

La actividad enzimática se evaluó en las mismas concentraciones especificadas en el párrafo anterior para el contenido proteico. En los controles se observó que la actividad de la APOX y GPOX fue mayor que la de la CAT (Figura 30). Para esta última enzima la actividad observada en los distintos tratados se mantuvo semejante al control, sin observarse diferencias significativas (test de Student $p>0.05$). La actividad de la GPOX se vio inhibida en un 33% para las concentraciones 12.9 y 25.81 mg/L, mientras que en la mayor concentración presentó una estimulación de su actividad del 20%, aunque no resultó significativa en ninguno de estos casos. Para el caso de la enzima APOX, se observó un incremento significativo de su actividad respecto el control para las tres concentraciones

evaluadas. Para esta enzima, se observó una estimulación de la actividad respecto del control del 70, 102 y 76 % para la menor, intermedia y mayor concentración respectivamente.

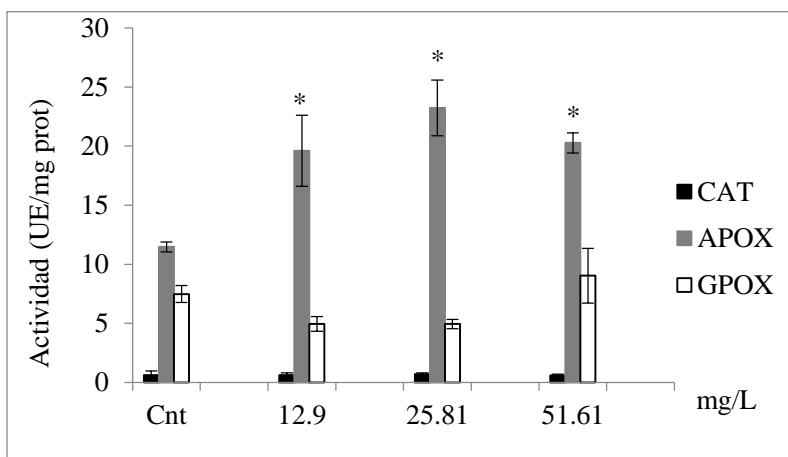


Figura 30. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a la mezcla 0.33 Ni-0.67 Zn. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

6.1.2.2 Análisis de la acción de mezclas binarias Ni/Zn sobre los parámetros evaluados

Se observó un alto grado de toxicidad en las combinaciones de concentraciones más altas para las tres relaciones de Ni-Zn evaluadas. Basándose en las variables de respuesta calculadas, la relación menos tóxica resultó ser la 1, que fue la que contenía las sumas de concentraciones más bajas.

Para las Relaciones 1 y 2 la variable de medición número de frondes resultó más afectada por las concentraciones evaluadas que el peso fresco. Esto se evidenció con valores más elevados de inhibición de las tasas. Por su parte en para la Relación 3, se observó un máximo de 100% de inhibición de las tasas tanto para número de frondes como para peso fresco en la concentración más elevada, pero al analizar las concentraciones más bajas, el peso fresco se mostró más sensible con inhibiciones más elevadas. Al analizar el porcentaje de inhibición del rendimiento (%Iy), la Relación 3 resultó ser la más tóxica, incluso con inhibiciones superiores a 50% en todos los tratados cuando éste estuvo calculado en base al peso fresco.

La relación frondes/colonias resultó afectada en las tres proporciones evaluadas. Éste índice se vio afectado más notablemente en la Relación 3, donde en todas las concentraciones se observó un decrecimiento significativo respecto al control, a diferencia de las dos restantes proporciones de la mezcla Ni-Zn donde en las concentraciones más bajas se observó un incremento, aunque no significativo, de éste índice respecto al control.

El contenido proteico fue afectado por los tratamientos evaluados de las tres proporciones de la mezcla, ya que se observó un decrecimiento de éste en todos los casos. La más afectada fue la Relación 2, donde todos los tratados evaluados fueron significativamente inhibidos respecto al control. En este sentido, Gautam et al. (2017), mencionan que una inhibición en el crecimiento inducido por el Ni, ha sido atribuido a una regulación negativa en la síntesis de proteínas y de las actividades de algunas enzimas responsables del metabolismo de las reservas energéticas.

La tasa basada en número de frondes obtenida para plantas *L. gibba* expuestas a 0.37 mg/L de Ni individual fue inhibida en un 6.6% respecto al control (Tabla 10), mientras que una concentración similar (0.38 mg Cd/L) presente en el medio de cultivo junto con el agregado de 6.32 mg Zn/L (Combinación menor de la Relación 1 (Tabla 44), presentó una inhibición mayor de dicha tasa (18.67%). Algo similar fue observado para estas concentraciones al tener en cuenta el peso fresco, donde la tasa para 0.37 mg Ni/L, evaluado en forma individual, fue inhibida un 1.76% (Tabla 10), mientras que la mezcla recién mencionada la inhibió en un 19.63% (Tabla 46). Una concentración de Zn (4.6 mg Zn/L) levemente menor que la presente en la mezcla mencionada, al evaluarse individualmente presentó una inhibición de la tasa basada en número de frondes del 4.83% (Tabla 21), la cual fue también menor que la observada en la mezcla; por el contrario, al calcularse en base al peso fresco la tasa fue inhibida un 23.4% (Tabla 21), la cual fue un poco mayor que la inhibición causada por la mezcla.

Algo similar a lo mencionado para el Ni se observó al analizar la inhibición de la tasa de la mayor combinación de la Relación 1 (Suma 107.36 mg/L) que fue de 88.15% y de 66.88% para número de frondes y peso fresco respectivamente (Tablas 45 y 46). Para el caso del número de frondes, el Ni en concentración similar a la de dicha mezcla, evaluado en forma individual (6 mg Ni/L), presentó una inhibición también del 80.1% (Tabla 10). Para el caso

del peso fresco, esta concentración individual de Ni, presentó una inhibición de la tasa del 38.4% (Tabla 10), la cual resultó algo menor que para el caso de la mezcla mencionada.

Mientras que la concentración de 1.46 mg Ni/L evaluada individualmente provocó una inhibición en la tasa de crecimiento basada en número de frondes del 56.1% (Tabla 10), una concentración similar junto con Zn (como la de la concentración intermedia de la Relación 1, conformada por 1.54 mg Ni/L + 25.3 mg Zn/L) presentó una inhibición similar de 46.95% (Tabla 45). Por su parte, una concentración similar de Zn (20.1 mg/L) evaluada individualmente mostró una inhibición de dicha tasa del 33.8% (Tabla 21); si bien esta concentración de Zn es algo menor que la presente en la mezcla, también se evaluó la inhibición de la tasa a una concentración de 36.7 mg Zn/L la cual fue de 38.6%, resultando, por lo tanto, en valores similares.

Considerando la menor combinación de la Relación 2 (compuesta por 0.29 mg Ni/L + 9.49 mg Zn/L), presentó una inhibición de la tasa de crecimiento basada en número de frondes del 19.16%; mientras que concentraciones similares de Ni y Zn (0.37 mg Ni/L y 9.2 mg Zn/L) evaluadas individualmente produjeron inhibiciones de dicha tasa del 6.6 y 14.6 % respectivamente (Tablas 10 y 21). Para esta variable de respuesta, el efecto de la mezcla, en las concentraciones mencionadas, fue similar a la suma de los efectos individuales. Por otro lado, al considerar la tasa en base al peso fresco, esta mezcla la inhibió en un 14.19% (Tabla 51), mientras que las concentraciones individuales de Ni y Zn mencionadas produjeron inhibiciones de 1.76 y 40.3 % respectivamente (Tablas 10 y 21). Esto fue diferente a lo observado para el número de frondes, ya que en este caso el efecto de la mezcla fue intermedio entre los efectos causados por los metales individuales.

La segunda menor concentración de la Relación 3, mostró una inhibición de la tasa del número de frondes del 41.40% (Tabla 55) y de la tasa del peso fresco del 59.57% (Tabla 56). Como se mencionó anteriormente, una concentración similar de Ni (0.37 mg/L) evaluada individualmente, inhibió la tasa calculada en base al número de frondes y peso fresco en un 6.60 y 1.76 % respectivamente (Tabla 10). Por su parte, una concentración similar de Zn (20.1 mg/L) evaluada individualmente, inhibió la tasa calculada en base al número de frondes y peso fresco en un 33.8 y 29.3 % respectivamente (Tabla 21). Por lo tanto el efecto inhibitorio observado en la mezcla para número de frondes fue

prácticamente la suma de los efectos observados en los metales individuales; mientras que para peso fresco, el efecto de la mezcla fue mayor que dicha suma.

La actividad enzimática fue afectada en los tratamientos con las mezclas respecto los controles. Al comparar las tres relaciones de la mezcla, se observó que en la menor combinación de concentraciones de la Relación 2 (9.78 mg/L) se obtuvieron las mayores estimulaciones de la actividad de las tres enzimas respecto a los controles. La actividad de la CAT por su parte no se vio afectada por ninguna de las combinaciones de concentraciones en la proporción donde el Zn se encontró en mayor concentración (Relación 3), mientras que en las dos mayores concentraciones de las Relaciones 1 y 2, la actividad de esta enzima fue significativamente menor con inhibiciones entre 60 y 70 % respecto a los controles. La actividad de la GPOX, por su parte fue estimulada en las tres concentraciones únicamente en la Relación 2; mientras que para las otras dos Relaciones (1 y 3), se observó estimulación únicamente en la mayor concentración de cada una, sin ser significativa en ningún caso. Se ha mencionado que el Ni y el Zn inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que causa un daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en la células vegetales (Gautam et al. 2017). Entre dichos EROs, se encuentra el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), cuya generación en exceso ha sido evidenciada en algunos casos en el presente trabajo por el incremento observado en la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas ya que dicha molécula es el sustrato de las mismas.

Al comparar la actividad de las enzimas individuales con la de las mezcla se pudieron observar algunas diferencias. Por ejemplo, al comparar la actividad de las tres enzimas de la menor concentración de la Relación 1, con la de las plantas expuestas a Ni individual a 0.37 mg/L, se observó una mayor actividad respecto al control en el segundo caso para la enzima CAT. En esta mezcla, la concentración de Ni era igual que la individual, pero con el agregado de 6.32 mg Zn/L. Al igual que para CAT, la enzima APOX también fue más estimulada en el caso de exposición a Ni individual. Por su parte, la enzima GPOX fue inhibida significativamente en dicha mezcla (suma 6.7 mg/L) (Figura 23) mientras que su actividad fue incrementada significativamente en las plantas expuestas a Ni individual (0.37 mg Ni/L).

Algo similar se observó al comparar la actividad enzimática del tratado 0.37 mg Ni/L con la segunda concentración de la Relación 3 (suma 25.81 mg/L, la cual contenía la misma

cantidad de Ni más el agregado de 25,43 mg Zn/L), donde la actividad de la CAT fue mayormente incrementada en el tratamiento individual que en la mezcla. Asimismo la actividad de la GPOX disminuyó levemente en la mezcla (sin ser significativa) pero en el tratamiento con Ni individual (0.37 mg/L) dicha actividad incremento significativamente respecto al control. En este caso, con respecto a la APOX, su actividad fue incrementada tanto en la mezcla (suma 25.81 mg/L) como por el tratado con Ni individual (0.37 mg/L) aunque proporcionalmente con el control fue mayor el incremento para el metal individual. En la mezcla con suma 12.9 mg/L de la Relación 3, conformada por 0.19 mg Ni/L + 12.71 mg Zn/L, fue la APOX la única que incrementó respecto al control (71%); mientras que en el tratamiento individual con 0.18 mg Ni/L, esta enzima también incremento significativamente aunque en menor proporción con el control (55%). En esta comparación, la actividad de la GPOX disminuyó respecto al control en la mezcla mientras que se observó un incremento en la exposición individual de Ni (0.18 mg/L) aunque en ningunos de estos casos fue un cambio significativo; y para la CAT se observó una pequeña inhibición respecto al control (10%) en la exposición individual, mientras que se mantuvo igual en dicha mezcla (suma 12.9 mg/L).

A pesar de que los metales Ni y Zn pertenecen al grupo de micronutrientes esenciales de las plantas, lo cual implica que cumplen cierto rol fisiológico en las mismas y su completa ausencia causa severos trastornos en el normal desarrollo de las mismas, como se demostró en el presente trabajo son causantes de toxicidad cuando se encuentran en exceso. Por parte del Ni, se han mencionado en los trabajos de Gautam et al. (2017) y Seregin y Kozhevnikova (2006), diferentes efectos tóxicos observados en plantas a causa de exposición a concentraciones excedentes a las óptimas de este metal, entre las que se pueden destacar la inhibición del crecimiento, la degradación de clorofila, interferencias en el sistema fotosintético, clorosis y necrosis como resultado de una perturbación en la incorporación de Fe y del metabolismo en general e inhibición de la división celular en meristema de raíz. Por exposición a concentraciones excesivas, el Zn también se ha asociado con inhibición del crecimiento a consecuencia de efectos severos sobre diferentes enzimas, o sobre procesos metabólicos fundamentales y también por causa de la reducción de tasa fotosintética (Gautam et al. 2017). Estos autores además han indicado que es común observar efectos negativos en la nutrición vegetal a causa del Zn, probablemente por la

deficiencia inducida de Fe y Mg, que son elementos que tienen un radio iónico similar al del Zn, y lo que conlleva a la aparición de clorosis.

6.1.2.3 Análisis de la interacción Ni/Zn

Los parámetros obtenidos del análisis de regresión múltiple entre la inhibición del número de frondes y las concentraciones de los metales en la mezcla se pueden observar en la tabla 59.

Tabla 59. Análisis de regresión múltiple de los efectos de mezclas binarias de Ni Zn sobre la inhibición en el número de frondes de *L. gibba*. R del modelo = 0.88

	b	ε	β	sig
Constante	26.537	6.055	--	0.001*
Ni	10.785	4.149	0.989	0.025*
Zn	0.274	0.125	0.830	0.050*
Ni x Zn	-0.064	0.046	-0.848	0.191

b: coeficientes de regresión

β: coeficientes estandarizados

ε: error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

En el modelo de regresión múltiple, se encontraron valores significativos ($p < 0.05$) para las constantes de los metales individuales, mientras que la constante de interacción entre ellos no resultó un parámetro significativo ($p > 0.05$) (Tabla 59). Utilizando los parámetros obtenidos en la regresión múltiple y calculando las concentraciones de los metales para el 50% de efecto sobre la variable de respuesta, se estiman las UT para cada una de las combinaciones binarias ensayadas. Estas UT y el promedio para esta mezcla se presentan en la primera columna de la Tabla 60 (esta tabla se repite en las tres mezclas por cuestiones de representación). Aquí se puede observar, que las mismas resultaron cercanas a 1. Estos datos mostraron un coeficiente de variación bajo, verificando poca dispersión y comportamiento similar entre las diferentes proporciones de las mezclas. Se pudo concluir

entonces, que para este caso se cumple con el modelo aditivo de toxicidad de la mezcla evaluada. A modo de ejemplo, se puede mencionar que para la mezcla de la Relación 1 con suma 26.84 mg/L, que contenía una concentración de Ni de 1.54 mg/L, se observó un %Inb del número de frondes del 52.5% (Tabla 45), mientras que por parte del Ni evaluado en forma individual en una concentración similar (1.46 mg/L), el efecto observado de este parámetro fue del 54% (Tabla 10). También para la mezcla con suma 53.58 mg/L de la Relación 1 (que contenía 3.08 mg Ni/L), se observó un 59.3% Inb del número de frondes (Tabla 45), contra una inhibición muy similar (63%) observada por una concentración individual de Ni 3.6 mg/L (Tabla 10). Otro ejemplo de inhibiciones parecidas en este caso para la Relación 2, fueron la mezcla con suma 19.55 mg/L (que contenía 0.58 mg Ni/L) y Ni individual de 0.92 mg/L, donde se observaron %Inb similares (50.8 y 48 %, respectivamente) (Tablas 50 y 10, respectivamente). Además de la Relación 3, la mezcla con suma 51.56 mg/L (contenía 0.76 mg Ni/L) mostró un %Inb del 39% (Tabla 55), mientras que 0.92 mg Ni/L en forma individual un %Inb similar (46%) (Tabla 10). También de la Relación 3, la suma de 206.47 mg/L (contenía 3.05 mg Ni/L) mostró un %Inb del 72.7% (Tabla 55), mientras que una similar (63%) fue observada para 3.6 mg Ni/L individualmente (Tabla 10).

La interacción entre los metales y los sistemas biológicos está dominada por las propiedades de sus formas ionizadas tanto como ácidos (especie química con capacidad de aceptar pares de electrones) o bases (especie química con capacidad de donar pares de electrones) de Lewis. Los sitios de reacción de dichos metales pueden ser oligosacáridos o proteínas presentes en las membranas biológicas. Los metales Zn y Ni son ácidos de Lewis y ácidos fuertes, por lo tanto, al pertenecer al mismo grupo, los iones de estos átomos (Zn^{+2} y Ni^{+2}) competirían por los mismos centros de reacción, como por ejemplo sitios con átomos de oxígeno y nitrógeno que actúan como bases duras presentes en las proteínas (Broadley et al. 2006; Montvydienė y Marčiulionienė 2007). Los metales utilizados en esta mezcla binaria pertenecen al grupo de los micronutrientes esenciales de los vegetales, lo cual, sumado a lo mencionado anteriormente de pertenecer al mismo grupo químico, por lo tanto también podría ocurrir que las plantas no tengan preferencia por la incorporación de uno u otro, lo cual llevaría a un efecto de interacción aditiva como la observada en el presente trabajo. Un comportamiento aditivo de estos dos metales también ha sido descripto

por Beckett y Davis (1978) en plantas jóvenes de cebada. Este mismo comportamiento entre micronutrientes esenciales de los vegetales ha sido observado, por ejemplo, para el caso de Cu^{+2} y Ni^{+2} , donde un comportamiento aditivo fue registrado para exposiciones binarias en *Spirodela polyrrhiza* (Montvydienė y Marčiulionienė 2007).

Tabla 60. Unidades tóxicas para cada combinación de concentraciones de las mezclas evaluadas. Media (promedio), DE (desvío estándar) y CV (coeficiente de variación).

Σ UT Ni Zn	Σ UT Cd Zn	Σ UT Cd Ni
0.90	0.69	1.49
0.95	0.72	1.59
1.04	0.77	1.63
1.16	0.79	5.46
0.93	0.71	1.46
0.93	0.75	1.54
1.00	0.80	1.64
1.11	6.31	5.14
1.16	0.73	1.43
0.95	0.78	1.49
1.04	0.75	1.58
1.16	4.77	1.63
Media: 1.03	1.55	2.17
DE: 0.09	1.89	1.66
CV: 8.89	122.3	76.2

6.1.2.4 Efectos de las diferentes proporciones de la mezcla Cd/Zn sobre el crecimiento y biomarcadores

Efectos de la Relación 1 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 61. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 1 de la mezcla Cd/Zn y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Cd (mg/L)	Concentración Zn (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.67	0.33	
58.45	87	145.45
29.18	43.87	73.05
14.33	22.12	36.45
7.29	10.89	18.18
3.54	6.15	9.69

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas con este en todos los casos (Tabla 62). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 13.17 y 100 % que resultaron significativas en todos los casos (Tabla 62). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa para todas las concentraciones y mostró un máximo de inhibición del 100% (Tabla 62). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 22.01 y 84.91 % siendo también significativa para las cinco combinaciones evaluadas (Tabla 62).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control, y aunque no se vio tan afectada como para el caso del número de frondes, se observaron diferencias significativas para todas las concentraciones respecto al control (Tabla 63). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 35.37 a 79.96 %, siendo significativa en todos los casos (Tabla 61). Por su parte la inhibición de la productividad (% Iy) llegó a un máximo del 91.55% y fue significativa también en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 63). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 47.70 y 76.90 %, siendo este máximo de inhibición menor que para el caso de número de frondes (84.91%), por lo tanto mostrando menor sensibilidad, aunque siendo en este caso también significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 63).

Tabla 62. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 1 de la mezcla Cd/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.270 (0.014)	-	-	-
9.69	0.235* (0.007)	13.17* (2.41)	25.93* (4.19)	22.01* (3.55)
18.18	0.147* (0.003)	45.71* (1.11)	68.15* (1.04)	57.86* (0.88)
36.45	0.066* (0.011)	75.77* (3.94)	89.63* (2.09)	76.10* (1.77)
73.05	0.054* (0.006)	80.06* (2.13)	91.85* (1.04)	77.98* (0.88)
145.45	0.000* (0.00)	100* (0.00)	100* (0.00)	84.91* (0.00)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 63. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el peso fresco de la Relación 1 de la mezcla Cd/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.262 (0.028)	-	-	-
9.69	0.169* (0.008)	35.37* (3.1)	56.79* (3.53)	47.70* (2.97)
18.18	0.074* (0.019)	71.65* (7.19)	87.02* (4.21)	73.10* (3.53)
36.45	0.084* (0.012)	67.74* (4.54)	84.64* (2.86)	71.10* (2.4)
73.05	0.068* (0.031)	74.14* (11.8)	88.45* (6.56)	74.30* (5.51)
145.45	0.052* (0.044)	79.96* (16.62)	91.55* (8.25)	76.90* (6.93)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la Relación 1 de la mezcla Cd/Zn, se pudo evidenciar que para la tasa de crecimiento, el parámetro de medición peso fresco resultó más sensible que el número de frondes en las dos menores concentraciones, mientras que en las tres mayores se observó lo opuesto. Al analizar el porcentaje de inhibición del rendimiento (% Ir) y el porcentaje de inhibición (% Inh) se observó también que las inhibiciones fueron mayores para peso fresco en las dos menores concentraciones, mientras que en las tres mayores la situación se revierte y pasan a ser las variables de respuesta calculadas en base al número de frondes las que mostraron mayor inhibición. Los máximos de inhibición tanto para % Ir, % Ir como para % Inh fueron mayores cuando se basaron en número de frondes.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Se observó para esta relación que el número de frondes fue significativamente inhibido en todas las concentraciones, mientras que el número de colonias mostró un incremento significativo en la concentración más baja evaluada (9.69 mg/L), pero a medida que ésta incremento este valor fue decreciendo hasta ser significativamente menor en las dos mayores concentraciones (73.05 y 145.45 mg/L) (Tabla 64). En cuanto a la proporción frondes/colonias, se observó que en todos los casos fue significativamente menor respecto al control (Tabla 64). Las concentraciones evaluadas en esta relación de Cd/Zn afectaron notoriamente la liberación de las frondes hijas, y presentaron una tendencia a la presencia de colonias con menos frondes. A partir de la concentración de 18.18 mg/L se observaron mayoritariamente colonias conformadas por una única fronde.

Tabla 64. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 1 de la mezcla Cd/Zn.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	79.5	26.5	3
9.69	62*	38.5*	1.6*
18.18	33.5*	27.5	1.2*
36.45	19*	17.5	1.1*
73.05	17.5*	15*	1.1*
145.45	12*	12*	1*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 6.69, 18.18 y 36.45 mg/L (Tabla 65). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control. En las plantas expuestas a 9.69 mg/L se observó una inhibición del 66%, la cual resultó estadísticamente significativa (test de Student $p < 0.05$) (Tabla 65). Se observó una inhibición del 47% en la concentración de 18.18 mg/L, también siendo esta significativa. Por su parte, se observó en la mayor concentración, una disminución significativa del contenido de proteína respecto al control con un 59% de inhibición.

Tabla 65. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Cd y Zn)			
	Cnt	9.69	18.18	36.45
Proteínas (mg/ml)	7.68 (1.62)	2.56* (0.67)	4.05* (0.16)	3.13* (0.9)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p < 0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en los mismos tratamientos que para el contenido proteico, es decir las plantas control y expuestas a las tres menores

combinaciones de Cd y Zn (Figura 31). En los controles la actividad de la GPOX fue levemente mayor que la de la APOX, mientras que la de la CAT fue la que presentó menor actividad. Se observó para la menor concentración (9.69 mg/L) que la enzima antioxidante que presentó mayor incremento respecto al control fue la GPO, siendo ésta una diferencia significativa (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). Para esta misma concentración la actividad de la APOX también se vio significativamente incrementada, mientras que la actividad de la CAT no se vio modificada. En la siguiente concentración (18.18 mg/L) se observó un comportamiento similar de las tres enzimas evaluadas, resultando la actividad de la GPOX y APOX estimuladas significativamente respecto al control; mientras que la actividad de la CAT tampoco se vio modificada en esta concentración. En la máxima concentración evaluada, si bien la que presentó mayor actividad fue la GPOX, la APOX fue la que proporcionalmente incremento más respecto al control, para ambas enzimas se observó un incremento significativo respecto al control. Por su parte, la actividad de la CAT en esta concentración se vio reducida significativamente (67% de inhibición) (Figura 31).

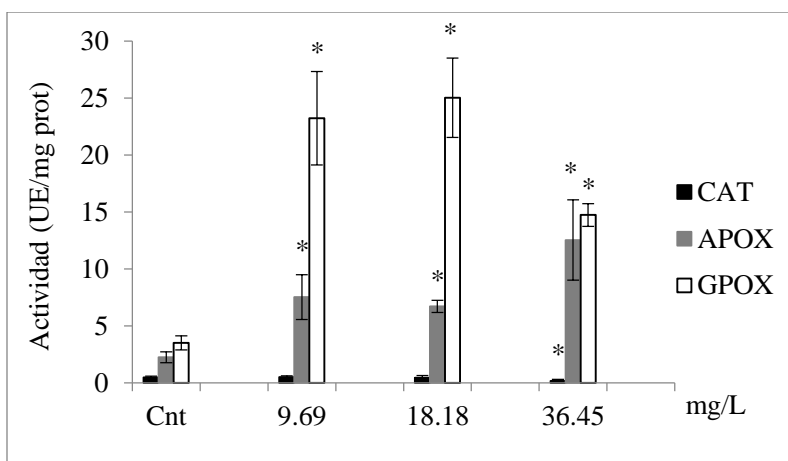


Figura 31. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a en la mezcla 0.67 Cd- 0.33 Zn. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Efectos de la Relación 2 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 66. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 2 de la mezcla Cd/Zn y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Cd (mg/L)	Concentración Zn (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.5	0.5	
44.57	135	179.57
22.17	67.41	89.58
10.15	32.83	42.98
5.54	16.85	22,40
2.64	8.88	11.52

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas con este en todos los casos (Tabla 67). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 16.27 y 100 % que resultaron significativas en todos los casos (Tabla 67). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa para todas las concentraciones y mostró un máximo de inhibición del 100% (Tabla 67). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 26.42 y 84.91 % siendo también significativa para las cinco combinaciones evaluadas (Tabla 67).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control y se observaron diferencias significativas para todas las

concentraciones respecto al control (Tabla 68). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 46.18 a 100 %, siendo significativa en todos los casos (Tabla 68).

Tabla 67. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Inh) considerando el número de frondes de la Relación 2 de la mezcla Cd/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.270 (0.014)	-	-	-
11.52	0.226* (0.009)	16.27* (3.19)	31.11* (5.23)	26.42* (4.44)
22.40	0,142* (0.003)	47.31* (1.15)	69.63* (1.04)	59.11* (0.88)
42.98	0.083* (0.005)	69.17* (1.74)	85.92* (1,04)	72.95* (0.88)
89.58	0.000* (0.00)	100* (0.00)	100* (0.00)	84.90* (0.00)
179.57	0.000* (0.00)	100* (0.00)	100* (0.00)	84.91* (0.00)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Por su parte la inhibición de la productividad (% Iy) también llegó a un máximo del 100% y fue significativa en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 68). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 57.10 y 85.40 %, siendo este máximo de inhibición muy similar que para el caso de número de frondes (84.91%), también en este caso resultó significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 68).

Tabla 68. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Inh) considerando el peso fresco de la Relación 2 de la mezcla Cd/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.262 (0.028)	-	-	-
11.52	0.141* (0.019)	46.18* (7.4)	67.98* (6.9)	57.10* (5.79)
22.40	0.047* (0.004)	82.13* (1.39)	92.62* (0.67)	77.80* (0.56)
42.98	0.044* (0.001)	83.37* (0.36)	93.21* (0.17)	78.30* (0.14)
89.58	0.018* (0.010)	93.27* (3.84)	97.50* (1.51)	81.90* (1.27)
179.57	0.000* (0.00)	100* (2.11)	100* (0.67)	85.40* (0.56)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la relación 2 de la mezcla Cd/Zn, se pudo evidenciar que la tasa de crecimiento basada en el peso fresco resultó más sensible para las tres menores concentraciones evaluadas (11.52, 22.40 y 42.98 mg/L) ya que se observó mayor inhibición que para el número de frondes. Por el contrario en la cuarta mayor concentración (89.58 mg/L) la tasa en base al número de frondes resultó más inhibida. En la mayor concentración ambas tasas fueron 100% inhibidas. Esto mismo se observó para el caso del porcentaje de inhibición del rendimiento, donde en las concentraciones más bajas los efectos fueron más evidentes al tener en cuenta el peso fresco, y en las concentraciones más elevadas la toxicidad fue muy elevada considerando ambas variables de medición. Al comparar la variable de respuesta % Inh, se observó mayor sensibilidad al tener en cuenta el peso fresco en las dos menores concentraciones, mientras que en las demás la toxicidad se evidencio de manera similar para ambas variables de medición.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Se observó para esta relación, que el número de frondes fue significativamente inhibido en todas las concentraciones, mientras que el número de colonias mostró un incremento significativo en la concentración más baja evaluada (11.52 mg/L), pero a medida que ésta incremento este valor fue decreciendo hasta ser significativamente menor en las dos mayores concentraciones (89.58 y 179.57 mg/L) (Tabla 69). La proporción frondes/colonias fue en todos los casos significativamente menor respecto al control (Tabla 69). Se evidenció por lo tanto que las concentraciones evaluadas en esta relación de Cd/Zn afectaron notoriamente la liberación de las frondes hijas, y presentaron una tendencia a la presencia de colonias con menos frondes.

Tabla 69. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 2 de la mezcla Cd/Zn.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	79.5	26.5	3
11.52	58.5*	40*	1.5*
22.40	32.5*	30	1.1*
42.98	21.5*	20	1.1*
89.58	12*	12*	1*
179.57	12*	12*	1*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 11.52, 22.40 y 42.98 mg/L (Tabla 70). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control. En las plantas expuestas a 11.52 mg/L se observó una inhibición del 88%, la cual resultó estadísticamente significativa (test de Student $p < 0.05$) (Tabla 70). Se observó una inhibición del 49% en la concentración de 22.40 mg/L, también siendo esta significativa. Por su parte, se observó en la mayor concentración evaluada, una disminución

significativa del contenido de proteína respecto al control con un 50% de inhibición (Tabla 70).

Tabla 70. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Cd y Zn)			
	Cnt	11.52	22.40	42.98
Proteínas	7.68	0.89*	3.93*	3.83*
(mg/ml)	(1.62)	(0.2)	(0.2)	(0.3)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p < 0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en los mismos tratamientos que para el contenido proteico, es decir las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Zn (Figura 32). En los controles la actividad de la GPOX fue levemente mayor que la de la APOX, mientras que la de la CAT fue la que presentó menor actividad. La actividad de la GPOX y APOX presentó un incremento de la actividad respecto al control que fue significativa en los tres tratamientos (Figura 32). En ambos casos el mayor incremento se dio en la menor concentración (11.52 mg/L), los cuales fueron de 1100 y 900 % respectivamente. Las plantas expuestas a ésta concentración, presentaron una actividad de CAT levemente superior al control, la cual no representó una diferencia significativa. En la concentración 22.40 mg/L las tres enzimas mostraron una actividad incrementada significativamente respecto a sus controles, las mimas fueron estimuladas en un 63% para la CAT, en un 500% para la APOX y un 1000% para la GPOX. En las plantas expuestas a la concentración más grande evaluada (42.98 mg/L) la GPOX y la APOX presentaron actividades estimuladas significativamente respecto a los controles (470 y 720 %) respectivamente. Por su parte en ésta concentración la CAT fue inhibida, aunque no significativamente (Figura 32).

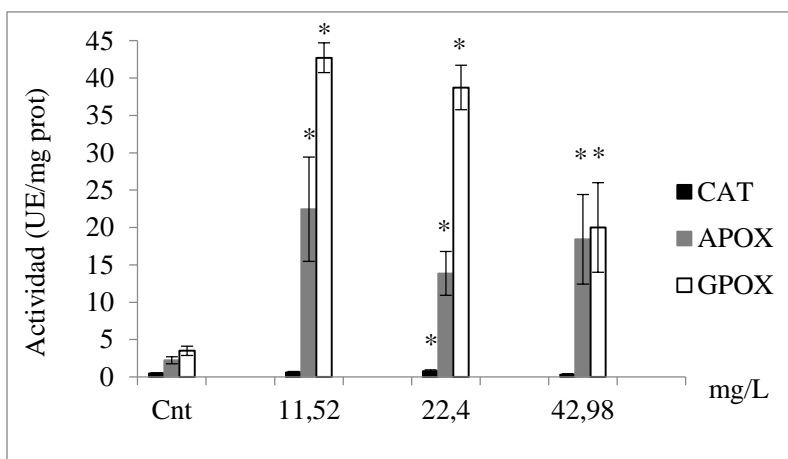


Figura 32. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a en la mezcla 0.5 Cd-0.5 Zn. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Efectos de la Relación 3 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 71. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 3 de la mezcla Cd/Zn y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Cd (mg/L)	Concentración Zn (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.33	0.67	
24.58	196.8	221.38
12.33	98.55	110.88
6.40	50.55	56.95
3.08	24.63	27.71
1.61	12.22	13.83

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas en las tres mayores concentraciones (Tabla 72). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango

de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 5.16 y 93.99 % que resultaron significativas en las tres mayores concentraciones (Tabla 72). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa para todas las concentraciones menos para la menor, y mostró un máximo de inhibición del 97.01% (Tabla 72). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 6.59 y 71.43 % siendo también significativa para las cuatro mayores combinaciones evaluadas (Tabla 72).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control, siendo todas las concentraciones inhibidas significativamente respecto al control (Tabla 73). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 34.70 a 75.77 %, siendo significativo para todas las concentraciones (Tabla 73). Por su parte la inhibición de la productividad (% Iy) llegó a un máximo del 89.67% y fue significativa en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 73). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 48.11 y 76.13 %, siendo también esta variable de respuesta inhibida significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 73).

Tabla 72. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 3 de la mezcla Cd/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.190 (0.013)	-	-	-
13.83	0.181 (0.029)	5.16 (0.84)	8.96 (1.45)	6.59 (1.07)
27.71	0.161 (0.04)	16.20 (4.42)	25.37* (6.9)	18.68* (5.09)
56.95	0.027* (0.021)	86.20* (11.2)	92.53* (6.33)	68.13* (4.66)
110.88	0.022* (0.014)	88.62* (7.59)	94.03* (4.22)	69.23* (3.1)
221.38	0.011* (0.00)	93.99* (0.00)	97.01* (0.00)	71.43* (0.00)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 73. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Inh) considerando el peso fresco de la Relación 3 de la mezcla Cd/Zn.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.270 (0.018)	-	-	-
13.83	0.176* (0.023)	34.70* (8.47)	56.67* (9.74)	48.11* (8.27)
27.71	0.143* (0.021)	47.10* (7.76)	69.44* (7.07)	58.96* (6)
56.95	0.131* (0.021)	51.41* (7.67)	73.22* (6.44)	62.17* (5.47)
110.88	0.113* (0.013)	58.15* (4.88)	78.56* (3.61)	66.70* (3.06)
221.38	0.065* (0.006)	75.77* (2.07)	89.67* (1.1)	76.13* (0.93)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la relación 3 de la mezcla Cd/Zn, se pudo evidenciar que la tasa de crecimiento basada en el peso fresco resultó más sensible para las dos menores concentraciones evaluadas (13.83 y 27.71 mg/L) ya que se observó mayor inhibición que para el número de frondes. Por el contrario, en las tres mayores concentraciones la tasa fue mayormente inhibida al tener en cuenta el número de frondes. Al ser evaluado en base al peso fresco, el rendimiento fue severamente afectado incluso en la concentración más baja (13.83 mg/L), donde se observó un 56,67% de inhibición, no así en el caso del número de frondes donde la concentración más baja no difirió significativamente del control. Al comparar la variable de respuesta % Inh, se observó también que el efecto sobre las plantas fue mejor evidenciado por el peso fresco en las dos menores concentraciones, mientras que en las mayores el efecto fue más severo sobre el número de frondes.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Se observó para esta relación, que el número de frondes fue decreciendo a medida que aumentaba la concentración de los metales en la mezcla, llegando a ser significativamente inhibido en las tres mayores concentraciones (Tabla 74). Por otra parte, el número de colonias mostró un incremento significativo en las dos menores concentraciones evaluadas (13.83 y 27.71 mg/L) y en las siguientes concentraciones éste baja a valores semejantes al control. La proporción frondes/colonias fue en todos los casos significativamente menor respecto al control (Tabla 74). Se evidenció por lo tanto que las concentraciones evaluadas en esta relación de Cd/Zn afectaron notoriamente la liberación de las frondes hijas, y presentaron una tendencia a la presencia de colonias con menos frondes.

Tabla 74. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 3 de la mezcla Cd/Zn.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	45.5	11.5	3.90
13.83	42.5	22.5*	1.90*
27.71	37	28.5*	1.30*
56.95	14.5*	14	1.03*
110.88	14*	12.5	1.10*
221.38	13*	11.5	1.10*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Zn, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 13.83, 27.71 y 56.95 mg/L (Tabla 75). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control. En las plantas expuestas a 13.83 mg/L se observó una inhibición del 71%, la cual resultó estadísticamente significativa (test de Student $p < 0.05$) (Tabla 75). Por otra parte, se observó una inhibición del 68% en la concentración de 27.71 mg/L, también

siendo esta significativa; mientras que en la mayor concentración evaluada (56.95 mg/L), se observó la mayor inhibición de esta Relación (85%) (Tabla 75).

Tabla 75. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Cd y Zn)			
	Cnt	13.83	27.71	56.95
Proteínas (mg/ml)	3.19 (0.32)	0.92* (0.2)	1.01* (0.29)	0.49* (0.13)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p < 0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en los mismos tratamientos que para el contenido proteico, es decir las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Zn (Figura 33). En todos los tratados, se observó que la actividad enzimática antioxidante de las tres enzimas evaluadas incremento significativo respecto de los controles. En las plantas expuestas a la concentración más baja de esta Relación (13.83 mg/L), la actividad de la APOX fue la más estimulada respecto al control (490%), mientras que las estimulaciones de CAT y GPOX fueron de 88 y 149 % respectivamente (Figura 33). La enzima que presentó mayor estimulación de la actividad en la concentración 27.71 mg/L fue la GPOX (695%), seguida por la APOX cuya estimulación fue de 445% y la de la CAT de 110%; la actividad de las plantas, expuestas a esta concentración, para las tres enzimas fue incrementada significativamente respecto al control (Figura 33). Las mayores estimulaciones de las actividades enzimáticas se observaron en la concentración más alta (56.95 mg/L), donde la CAT incrementó en un 114%, la APOX en un 1170% y la GPOX en un 1210%; siendo en todos los casos significativa.

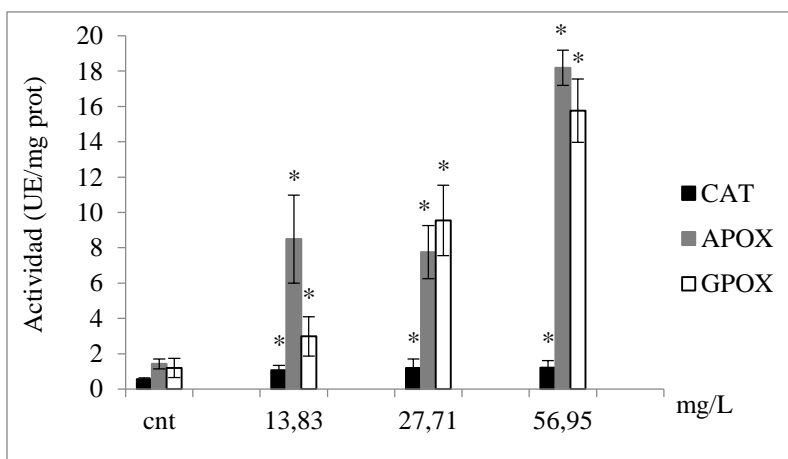


Figura 33. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a en la mezcla 0.33 Cd-0.67 Zn. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

6.1.2.5 Análisis de la acción de mezclas binarias Cd/Zn sobre los parámetros evaluados

Se observó un alto grado de toxicidad en las combinaciones de concentraciones más altas para las tres relaciones de Cd-Zn evaluadas. Basándose en las variables de respuesta calculadas, la relación menos tóxica resultó ser la 3, que fue en la que el Zn se encontró en mayor concentración.

Para las Relaciones 1 y 3, la variable de medición número de frondes resultó más afectada por las concentraciones evaluadas que el peso fresco. Esto se evidenció con valores más elevados de inhibición de las tasas. Por su parte la Relación 2 resultó la más tóxica ya que fue la única relación en la que se observó un máximo de 100% de inhibición en las tasas calculadas tanto para número de frondes como para peso fresco; más aún para el caso de número de frondes se observó un 100% de inhibición en las dos mayores concentraciones. Para esta Relación, al analizar las tres concentraciones más bajas, el peso fresco se mostró más sensible con inhibiciones más elevadas. En las Relaciones 1 y 3, al analizar el rendimiento, este resultó más sensible cuando fue basado en el peso fresco para las dos menores concentraciones, en cambio para las tres mayores concentraciones la sensibilidad se invierte presentando mayores porcentajes de inhibición el número de frondes. Por otro lado, al analizar la Relación 2, se observó una mayor sensibilidad del rendimiento al ser basado en el peso fresco para las tres menores concentraciones, mientras que en la mayor

concentración esta variable de respuesta llega a un 100% de inhibición para peso fresco y también para número de frondes.

La relación frondes/colonias resultó afectada en las tres proporciones evaluadas de forma similar. Éste índice se vio ligeramente menos afectado en la Relación 3. Al analizar este índice, se observó un decrecimiento significativo respecto al control en todas las concentraciones de la mezcla Cd-Zn

El contenido proteico fue afectado en gran medida por los tratamientos evaluados de las tres proporciones de la mezcla, ya que se observó un decrecimiento significativo de éste en todos los casos. La más afectada fue la Relación 2, donde se observó el mayor porcentaje de inhibición (89%) en la menor concentración.

La tasa basada en número de frondes obtenida para plantas *L. gibba* expuestas a 4.13 mg/L de Cd individual fue inhibida en un 23.1% respecto al control (Tabla 32), mientras que una concentración similar (3.54 mg Cd/L) presente en el medio de cultivo junto con el agregado de 6.15 mg Zn/L (Combinación menor de la Relación 1 (Tabla 61)), inhibieron dicha tasa en un 13.17%, es decir se pudo apreciar en este caso una reducción del efecto tóxico cuando el Zn estuvo presente en dicha concentración. Algo similar fue observado para estas concentraciones al tener en cuenta el peso fresco, donde la tasa para 4.13 mg Cd/L, evaluado en forma individual, fue inhibida un 65.9% (Tabla 32), mientras que la mezcla recién mencionada la inhibió en solo un 35.37% (Tabla 63). En diferentes trabajos se ha sido mencionado un efecto protector del Zn en la toxicidad del Cd, en los cuales se plantea que la misma sería debido a un resultado entre la interacción competitiva por los transportadores de incorporación en membrana y una acción protectora del Zn ante el estrés oxidativo (Versieren et al. 2017; 2016, Cherif et al. 2011, Aravind y Prasad 2005). Por su parte una concentración de 4.6 mg Zn/L evaluada en forma individual, inhibió la tasa de crecimiento en base al número de frondes en un 4.83% y en base al peso fresco en un 23% (Tabla 21), siendo en ambos casos una inhibición menor que la observada en la mezcla arriba mencionada (teniendo en cuenta que tenían concentraciones similares de este metal), indicando un incremento en la toxicidad por el agregado de Cd al medio.

En el caso de la menor concentración de la Relación 2 (suma 11.52 mg/L) se observó una inhibición de la tasa de crecimiento basada en número de frondes del 16.27% (Tabla 67) y de 46.18% cuando estuvo basada en el peso fresco (Tabla 68). Se evaluó individualmente

una concentración similar de Cd (2.06 mg Cd/L) a la contenida en dicha mezcla, y las plantas mostraron una inhibición de la tasa del 15.1% y del 57.7% para número de frondes y peso fresco respectivamente. Por su parte también se evaluó individualmente una concentración similar de Zn (9.2 mg Zn/L) a la contenida en esa mezcla, y las plantas mostraron una inhibición de la tasa del 14.6% y del 40.3% para número de frondes y peso fresco respectivamente. Por lo tanto, teniendo en cuenta el número de frondes, se observó una inhibición similar cuando se evaluaron individualmente las concentraciones mencionadas de Cd y Zn y cuando estas fueron evaluadas juntas en una mezcla. Mientras que teniendo en cuenta el peso fresco, la inhibición de la tasa por parte de la concentración de Cd individual fue mayor que la de la mezcla, y la de la concentración de Zn individual fue menor que la de la mezcla. Esto podría estar indicando también que la presencia de Zn en el medio estaría reduciendo los efectos tóxicos, sobre la variable de medición peso fresco, que causaría el Cd estando solo en solución para estas concentraciones.

Por otra parte, se observó que la inhibición de la tasa de la menor mezcla de la Relación 3 (Suma 13.83 mg/L) fue de 5.16% y de 34.70% para número de frondes y peso fresco respectivamente (Tablas 72 y 73). Para el caso del número de frondes, el Cd y Zn en concentraciones similares a las de dicha mezcla, evaluados en forma individual (2.06 mg Cd/L y 9.2 mg Zn/L), presentaron inhibiciones mayores (15.1 y 14.6 % respectivamente, (Tablas 32 y 21). Para el caso del peso fresco, estas concentraciones individuales de Cd y Zn, presentaron una inhibición de la tasa del 57.7 y 40.3 % respectivamente, la cual también resultaron mayores que para el caso de la mezcla mencionada. Esta menor toxicidad observada en la mezcla podría deberse a una consecuencia de una menor proporción del metal más tóxico (Cd), ya que la misma es una combinación de la Relación 3.

Por el contrario, la tasa en base al número de frondes de las plantas expuestas a 8.26 mg Cd/L y 9.2 mg Zn/L, en forma individual, presentó una inhibición del 24.8% y 14.6% respectivamente; mientras que la mezcla que presentó concentraciones similares de ambos metales (suma 18.18 de Relación 1 (Tabla 51) mostró una inhibición mayor (45.71%). Esto podría deberse a que la mezcla en cuestión comprende una sumatoria de concentraciones de 18.18 mg/L, que resulta mayor a las mencionadas en la discusiones de los párrafos anteriores y además fue una combinación perteneciente a la Relación 1 que es la relación

que contiene una mayor concentración del metal más tóxico, que fue el Cd, considerando además que ha sido mencionado que el Cd puede interferir con el rol fundamental en numerosas funciones celulares llevadas a cabo por el Zn, que es un micronutriente esencial, debido a la similitud química entre ambos metales (Tkalec et al. 2014).

La actividad enzimática fue afectada en los tratamientos con las mezclas respecto los controles. Al comparar las tres relaciones de la mezcla, se observó que la actividad de las enzimas APOX y GPOX fue estimulada significativamente en todas las mezclas evaluadas, mientras que la CAT fue únicamente estimulada significativamente en las tres concentraciones de la Relación 3 y en la concentración 22.4 mg/L de la Relación 2. En la mayor combinación de concentraciones de la Relación 3 (56.95 mg/L) se obtuvieron las mayores estimulaciones de la actividad de las tres enzimas respecto a los controles. Únicamente se observó inhibición significativa de la actividad de una de las enzimas para el caso de la CAT, y fue en la concentración más grande de la Relación 1 (suma 35.45 mg/L) es decir en la relación donde el componente tóxico principal fue el Cd. En general, en las tres proporciones, las enzimas predominantes resultaron ser GPOX y APOX. Particularmente en la Relación 1, donde Cd tiene mayor influencia en la toxicidad (debido a la carga de UT) se observó en general una superioridad en la estimulación de la actividad de GPOX, pero en la Relación 3, donde por el contrario el Zn está presente con UT mayores, la estimulación de la actividad de la GPOX se equipara con la de la APOX, y donde incluso ésta última es mayor en el caso de la menor concentración (suma 13.83 mg/L).

Al comparar la actividad de las enzimas individuales con la de las mezcla se pudieron observar algunas diferencias. Por ejemplo, la actividad de la CAT en las plantas expuestas a 4.6 mg Zn/L en forma individual, presentó un incremento de 30% respecto al control (Figura 22); mientras que la actividad de dicha enzima en la mezcla de suma 9.69 mg/L, que contenía una concentración similar de Zn (6.15 mg Zn/L más el agregado de 3.54 mg Cd/L) no mostró diferencia con el control (Figura 31). Por el contrario, al comparar la actividad de la APOX en los casos recién mencionados, se observó mayor porcentaje de estimulación en la mezcla (235%) (Figura 31), que la causada por el Zn evaluado individualmente (84%) (Figura 22). Lo mismo ocurre para el caso de la GPOX, donde se

observó mayor porcentaje de estimulación de la actividad en la mezcla (563%) (Figura 31), que la causada por el Zn evaluado individualmente (17%) (Figura 22).

Por otro lado, la actividad de la CAT en las plantas expuestas a 2.06 mg Cd/L en forma individual, mostró una inhibición del 14% (Figura 26); mientras que la actividad de dicha enzima en la mezcla de suma 11.52 mg/L, que contenía una concentración similar de Cd (2.64 mg Cd/L más el agregado de 8.88 mg Zn/L) mostró una estimulación del 30% (Figura 32). Algo similar se observó, al comparar la actividad de la APOX en los casos recién mencionados, ya que se observó mayor porcentaje de estimulación en la mezcla (900%) (Figura 32), que la causada por el Cd evaluado individualmente (142%) (Figura 26), y también al comparar la actividad de la GPOX, donde se observó mayor porcentaje de estimulación en la mezcla (1100%) (Figura 32), que por el Cd evaluado individualmente (685%) (Figura 26). Este incremento en la actividad de enzimas antioxidantes en tratamientos de Cd suplementados con Zn ha sido mencionado en otros trabajos (Cherif et al. 2011; Aravind y Prasad 2003). Es sabido que el Zn es un micronutriente vegetal y cuando no se encuentra en exceso, situación en la cual se vuelve tóxico, es beneficioso para los mismos ya que tiene la propiedad de existir en un estado de univalencia bajo condiciones fisiológicas, lo cual le permite no experimentar el ciclo redox. Esto se debe a que el Zn elemental contiene dos electrones externos que son fácilmente perdidos en agua a pH 7.4 para formar Zn^{+2} . No ocurre una reducción adicional a Zn^{+1} o Zn^0 ya que no existe ningún reductor biológico con la fuerza suficiente; ni tampoco el Zn^{+2} puede ser oxidado nuevamente a Zn^{+3} ya que este posee un orbital 3d completo, para lo cual quitar un electrón requeriría más energía que la que puede aportar cualquier oxidante biológico conocido. Por lo tanto el Zn es estable en medio biológico, actuando como divalente catiónico que lleva a cabo sus funciones bioquímicas principalmente cuando está unido a enzimas y otras proteínas. El mismo se une por ejemplo a los grupos tiol de proteínas de membrana y las protege, así como a los fosfolípidos, de la oxidación de los tioles y de la formación de disulfuros, resultando en una protección de la oxidación de sulfidrilos y daño estructural inducidos por el Cd (Aravind y Prasad 2005).

Comparando nuevamente la actividad de la CAT de las plantas expuestas a 2.06 mg Cd/L en forma individual, que como se mencionó en el párrafo anterior mostró una inhibición del 14% (Figura 26), pero en este caso con la mezcla de suma 13.83 mg/L de la Relación 3, que

contenía una concentración similar de Cd (1.61 mg Cd/L) más el agregado de 12.22 mg Zn/L, también se observó que para la mezcla la actividad de la enzima fue mayormente estimulada (88%) (Figura 33). Lo mismo fue observado para la enzima APOX, donde la actividad de la mezcla mencionada fue mayor que para el caso del metal evaluado individualmente (260 y 140 % respectivamente) (Figuras 33 y 26). Por su parte al analizar la actividad de la GPOX en esta concentración individual de Cd y en la mezcla mencionada, se observó que la actividad fue mayormente estimulada para el primer caso (685%) (Figura 26) que en el segundo (150%) (Figura 33); contrariamente que las actividades de las otras enzimas, donde fueron mayormente incrementadas en las mezclas. En el trabajo de Versieren et al. 2017, donde trabajaron con raíces de cebada expuestas a Cd y Zn en forma individual y en mezcla binaria, observaron también que las actividades de ciertas enzimas antioxidantes como la catalasa, ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa, fueron en general mayormente estimuladas por parte de las mezclas respecto de las exposiciones individuales, aunque no de forma significativa.

6.1.2.6 Análisis de la interacción Cd/Zn

Los parámetros obtenidos del análisis de regresión múltiple entre la inhibición del número de frondes y las concentraciones de los metales en la mezcla se pueden observar en la tabla 76.

Tabla 76. Análisis de regresión múltiple de los efectos de mezclas binarias de Cd Zn sobre la inhibición en el número de frondes de *L. gibba*. R del modelo = 0,834

	b	ε	β	sig
Constante	20.029	9.514	--	0.059
Cd	2.571	0.704	1.613	0.004*
Zn	0.545	0.196	1.116	0.018*
Cd x Zn	-0.023	0.009	-1.824	0.021*

b: coeficientes de regresión

β: coeficientes estandarizados

ε: error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Estos parámetros permitieron determinar que existe interacción entre las concentraciones de Cd y Zn, ya que se encontraron valores de significación menores a 0.05. Con el fin de conocer si esta interacción es aditiva, sinérgica o antagónica, se calcularon las sumatorias de las Unidades Tóxicas (UT) para los metales en la mezcla para todas las relaciones ensayadas y se obtuvo un promedio de UT. Estos resultados se pueden observar en la segunda columna de la Tabla 77. Si bien este valor permitiría definir que la acción de los metales en la mezcla es antagónica, ya que, el promedio de las UT es mayor a 1 como se explicó en Materiales y Métodos Sección 5.7.2.11, se encontró un CV muy elevado, y solo dos combinaciones binarias de doce, presentaron $UT \gg 1$, 6.31 y 4.77 (resaltadas en negro en la columna central de la tabla 77). Las diez restantes tuvieron UT menores a 1 (Tabla 77). En esta situación, se analizaron las UT individuales para comprender mejor la interacción de estos metales separándolas en dos grupos ($UT < 1$ y $UT > 1$)

Grupo $UT < 1$: Si comparamos la acción inhibitoria del Cd, sobre el número de frondes de manera individual, con la inhibición encontrada cuando el metal se encuentra en mezclas binarias con el Zn, se pudo distinguir una acción sinérgica hasta ciertos valores umbrales de concentración de Zn. Se pudo ver que, cuando el Cd está presente en mezclas con concentraciones de Zn hasta 50 mg/L, la acción del Cd se ve potenciada por la presencia del Zn, ejerciendo efectos inhibitorios mucho mayores que cuando se encuentra en forma individual; un ejemplo de este fenómeno mencionado, es cuando comparamos el porcentaje de inhibición (%Inb) del número de frondes de la mezcla de la Relación 1 con suma 18.18 mg/L (que contenía 7.29 mg Cd/L) con el observado para una concentración similar, incluso un poco mayor, de Cd evaluada individualmente (8.25 mg/L) donde la inhibición resultó mayor en el caso de la mezcla (57.8% vs 31%) (Tablas 62 y 32, respectivamente). Otro ejemplo de la misma situación resultó de comparar el %Inb del número de frondes de la mezcla con suma 36.45 mg/L (que contenía 14.33 mg Cd/L) de la Relación 1, con el observado para una concentración similar, incluso un poco mayor, de Cd evaluada individualmente (16.5 mg/L) donde la inhibición resultó mayor en el caso de la mezcla (76.1% vs 41%) (Tablas 62 y 32, respectivamente); o cuando comparamos el %Inb del número de frondes de la mezcla con suma 56.95 mg/L (que contenía 6.4 mg Cd/L) de la Relación 3, con el observado para una concentración similar de Cd evaluada individualmente (8.25 mg/L) donde la inhibición resultó mayor en el caso de la mezcla

(68.1% vs 31.5%) (Tablas 72 y 32, respectivamente). En este caso la acción del Cd en mezclas con Zn, fue mucho mayor respecto de su toxicidad individual, concluyendo que el efecto de la mezcla binaria fue mucho más que aditiva o sinérgica.

Grupo UT > 1: Sin embargo, en mezclas donde las concentraciones de Zn fueron 135 y 196 mg/L, la sumatoria de las UT resultaron mucho mayores a 1 (6.31 y 4.77, respectivamente), indicando una acción antagónica o menos que aditiva. En estas dos situaciones las plantas fueron expuestas a mezclas donde las concentraciones de los metales fueron mucho mayores a sus CE50. Por ejemplo, en el caso de la mezcla 135 mg Zn/L + 50 mg Cd/L, la inhibición en el número de frondes observada fue de 84%, mientras que en el efecto individual de Cd a dicha concentración, la inhibición corresponde al 100%. Puede inferirse entonces que al menos para las dos combinaciones binarias Cd-Zn mencionadas, no hay una suma de sus efectos basados en las concentraciones de referencia individuales, sino por el contrario se observan efectos opuestos o antagónicos.

Tabla 77. Unidades tóxicas para cada combinación de concentraciones de las mezclas evaluadas. Media (promedio), DE (desvío estándar) y CV (coeficiente de variación).

Σ UT Ni Zn		Σ UT Cd Zn	Σ UT Cd Ni
	0.90	0.69	1.49
	0.95	0.72	1.59
	1.04	0.77	1.63
	1.16	0.79	5.46
	0.93	0.71	1.46
	0.93	0.75	1.54
	1.00	0.80	1.64
	1.11	6.31	5.14
	1.16	0.73	1.43
	0.95	0.78	1.49
	1.04	0.75	1.58
	1.16	4.77	1.63
Media	1.03	1.55	2.17
DE:	0.09	1.89	1.66
CV:	8.89	122.3	76.2

En cuanto a los efectos sinérgicos, se ha planteado que este tipo de interacción ocurriría cuando la detoxificación de ambos metales depende del mismo sistema celular de secuestro; mientras que particularmente los efectos de combinaciones de Cd y Zn no son atribuibles a la saturación de un único mecanismo en común de detoxificación (Sharma et al. 1999). Recientemente se ha demostrado que el Cd y el Zn comparten algunos transportadores de membrana como MTP1, transportadores ZIP, transportadores ortólogos de TaLCT1 o por vía no selectiva mediante canales de cationes (Martinka et al. 2014) (Aravind y Prasad 2005). En este sentido, ha sido propuesto que en ciertas concentraciones puede existir una fuerte interacción entre el Cd y el Zn por los mismos transportadores de membrana, causando una reducción en la incorporación que cuando están solos (Cherif et al. 2011). En otro trabajo, se ha observado en cebada, también un efecto protector del Zn en mezcla con Cd; el cual plantean puede estar atribuido a una reducción de la peroxidación lipídica ya que el Zn produce un efecto estabilizador y protector del estrés oxidativo, siendo por ejemplo un cofactor importante de la enzima superóxido dismutasa puede además incentivar la actividad de otras enzimas antioxidantes que reaccionan con especies reactivas del oxígeno protegiendo la célula de estrés oxidativo (Versieren et al. 2016; Gautam et al. 2017). En ese mismo trabajo se interpreta también que el antagonismo observado puede deberse a una competencia por la incorporación o por los transportadores de membrana por parte de los iones metálicos libres. En el presente estudio, el antagonismo fue observado en las mezclas donde la concentración de Zn fue alta (>50 mg/L) mientras que esto no ocurrió con menores concentraciones. Esto podría deberse a que a menores concentraciones los transportadores encargados de incorporar el metal en la planta no estaban saturados. Algo similar fue planteado por Sharma et al. 1999, donde también se estudió la toxicidad del Cd y Zn en mezclas binarias sobre *Silene vulgaris*, en cuanto a que los mayores aumentos en las concentraciones de los metales eventualmente decrece el grado de sinergismo, posiblemente como resultado de un incremento de antagonismo a nivel de la incorporación de los mismos; mencionando además que este decrecimiento en el sinergismo puede ser explicado en parte a que el antagonismo en la incorporación tiende a ser más grande en altas concentraciones. Justamente en la mezcla binaria de estos metales, en el presente trabajo, el análisis de las UT concluye antagonismo en las combinaciones donde la concentración de los metales fue mayor. En concordancia con lo encontrado en el

presente trabajo, ha sido manifestado por Papoyan et al. (2007), que las plantas de la especie *Thlaspi caerulescens* creciendo en presencia de altas concentraciones de Zn (33 mg/L), son capaces de tolerar alta concentración de Cd en el medio, y acumular significativamente más Cd que las plantas que fueron expuestas a menores concentraciones de Zn (0.065 mg/L).

6.1.2.7 Efectos de las diferentes proporciones de la mezcla Cd/Ni sobre el crecimiento y biomarcadores.

Efectos de la Relación 1 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 78. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 1 de la mezcla Cd/Ni y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Cd (mg/L)	Concentración Ni (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.67	0.33	
55.80	3.23	59.03
27.90	1.61	29.51
13.95	0.81	14.76
6.98	0.40	7.38
3.49	0.20	3.69

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas con este en todas las concentraciones (Tabla 79). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 22.98 y 96.99 % que resultaron significativas en todos los casos (Tabla 79). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa

para todas las concentraciones y mostró un máximo de inhibición del 98.51% (Tabla 79). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 26.37 y 72.53 % siendo también significativa para las cinco combinaciones evaluadas de esta Relación (Tabla 79).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control, y se observaron diferencias significativas para todas las concentraciones respecto al control (Tabla 80). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 53.15 a 90.08 %, siendo significativa en todos los casos (Tabla 80). Por su parte la inhibición de la productividad (% Iy) llegó a un máximo del 98.51% y fue significativa también en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 80). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 63.40 y 81.79 %, siendo este máximo de inhibición mayor que para el caso de número de frondes (72.53%), y siendo también significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 80).

Tabla 79. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 1 de la mezcla Cd/Ni.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.190 (0.013)	-	-	-
3.69	0.147* (0.003)	22.98* (1.58)	35.82* (2.11)	26.37* (1.55)
7.38	0.099* (0.008)	48.05* (4.42)	64.18* (4.22)	47.25* (3.10)
14.76	0.102* (0.012)	46.58* (6.50)	62.68* (6.33)	46.15* (4.66)
29.51	0.054* (0.006)	71.72* (3.03)	83.52* (2.11)	61.53* (1.55)
59.03	0.006* (0.008)	96.99* (4.24)	98.51* (2.11)	72.53* (1.55)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 80. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Inh) considerando el peso fresco de la Relación 1 de la mezcla Cd/Ni.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.270 (0.018)	-	-	-
3.69	0.127* (0.005)	53.15* (1.93)	74.67* (1.57)	63.40* (1.33)
7.38	0.131* (0.006)	51.54* (2.24)	73.33* (1.89)	62.26* (1.6)
14.76	0.149* (0.016)	44.84* (5.94)	67.33* (5.66)	57.17* (4.8)
29.51	0.066* (0.009)	75.55* (3.25)	81.11* (1.72)	68.87* (1.46)
59.03	0.027* (0.061)	90.08* (22.72)	96.33* (8.01)	81.79* (6.80)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

El cálculo de las diferentes variables de respuesta permitió evidenciar un efecto tóxico por parte de la mezcla Cd/Ni en las proporciones evaluadas sobre la macrófita *L. gibba*. Al analizar la relación 1 de la mezcla Cd/Ni, la tasa de crecimiento basada en el peso fresco resultó más sensible que la basada en número de frondes para las menor concentración evaluada (3.69 mg/L) ya que se observó una mayor inhibición, incluso mayor al 50%; aunque en las mayores concentraciones las sensibilidades se igualan, incluso siendo un poco mayor la inhibición basada en número de frondes en la concentración más elevada (59.03 mg/L). Algo similar fue observado para el caso del porcentaje de inhibición del rendimiento, donde para las tres concentraciones más bajas los efectos fueron más evidentes al tener en cuenta el peso fresco, mientras que esta situación se invierte para las dos más grandes. Al comparar la variable de respuesta % Inh, se observó mayor sensibilidad al tener en cuenta el peso fresco en todas las concentraciones, ya que mostró en todos los casos porcentajes de inhibición mayores.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Para esta relación, se observó que el número de frondes fue significativamente inhibido en todas las concentraciones, mientras que el número de colonias incrementó significativamente respecto del control en las cuatro menores concentraciones, pero en la mayor, éste decreció al valor del control (Tabla 81). Además, las plantas expuestas a las cinco combinaciones de concentraciones presentaron una relación frondes/colonias significativamente inhibida con respecto al control (Tabla 81). Se evidencia de esta forma una clara tendencia a la desintegración de las colonias en todos tratados. La gran mayoría de las plantas expuestas a la mayor concentración estaban compuestas por una única fronde.

Tabla 81. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 1 de la mezcla Cd/Ni.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	45.5	11.5	3.95
3.69	33.5*	28*	1.19*
7.38	24*	22.5*	1.06*
14.76	24.5*	21.5*	1.13*
29.51	17.5*	17*	1.02*
59.03	12.5*	11.5	1.08*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Ni, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 3.69, 7.38 y 14.76 mg/L (Tabla 82). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control. En las plantas expuestas a 3.69 mg/L se observó una inhibición del 30%, la cual no resultó estadísticamente significativa (test de Student $p < 0.05$) (Tabla 82). Por otra parte, se observó una inhibición del 47% en la concentración de 7.38 mg/L, siendo en este caso significativa; mientras que en la mayor concentración evaluada (14.76 mg/L), se observó una inhibición similar (49%) (Tabla 82).

Tabla 82. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Cd y Ni)			
	Cnt	3.69	7.38	14.76
Proteínas (mg/ml)	1.64 (0.4)	1.16 (0.25)	0.87* (0.19)	0.83* (0.18)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p < 0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en los mismos tratamientos que para el contenido proteico, es decir las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Ni (Figura 34). En los controles las actividades de la APOX y de la GPOX fueron prácticamente iguales y mayores que la de la CAT, que fue la que presentó menor actividad. La actividad de la GPOX y APOX presentó un incremento de sus actividades respecto al control que fue significativa en los tres tratamientos; mientras que la actividad de la CAT fue inhibida en todos los tratamientos (Figura 34). En la menor concentración evaluada (3.69 mg/L), la actividad de la GPOX fue estimulada en un 137% respecto al control, la de la APOX fue estimulada un 103%, y la de la CAT fue inhibida un 78%; en todos estos casos las diferencias fueron significativas respecto al control (ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)) (Figura 34). En la siguiente concentración (7.38 mg/L) la inhibición de la actividad de la CAT fue la misma, pero las actividades de GPOX y APOX fueron aún más estimuladas (349 y 327 %, respectivamente). En la mayor concentración evaluada (14.76 mg/L) la CAT mostró una inhibición un poco mayor a la mostrada en las concentraciones anteriores (82.5%); mientras que la actividad de la GPOX y APOX también fue estimulada significativamente (307 y 243 %, respectivamente) (Figura 34).

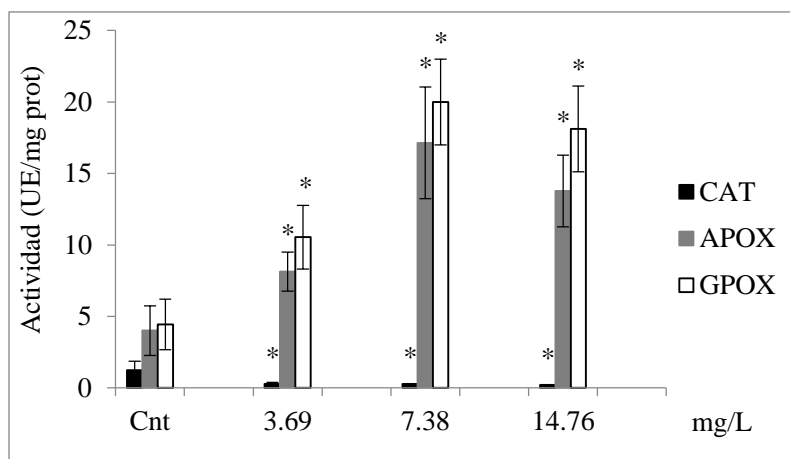


Figura 34. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a en la mezcla 2/3Cd-1/3Ni. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Efectos de la Relación 2 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 83. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 2 de la mezcla Cd/Ni y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Cd (mg/L)	Concentración Ni (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.5	0.5	
41.85	4.09	45.94
20.93	2.05	22.98
10.46	1.02	11.48
5.23	0.51	5.74
2.62	0.26	2.88

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas en las tres mayores concentraciones (Tabla 84). Para este parámetro, las cinco combinaciones de concentraciones evaluadas mostraron un rango de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 13.99 y 76.56 % que resultaron significativas

en las tres mayores concentraciones (Tabla 84). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa para todas las concentraciones menos para la menor, y mostró un máximo de inhibición del 87.34% (Tabla 84). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 18.45 y 66.99 % siendo también significativa para las cuatro mayores combinaciones evaluadas (Tabla 84).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control, siendo todas las concentraciones inhibidas significativamente respecto al control (Tabla 85). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 32.15 a 64.72 %, siendo significativo para todas las concentraciones (Tabla 85). Por su parte, la inhibición de la productividad (% Iy) llegó a un máximo de 80.32% y fue significativa en todas las combinaciones evaluadas (Tabla 85). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 39.09 y 63.14 %, siendo también esta variable de respuesta inhibida significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 85).

Tabla 84. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 2 de la mezcla Cd/Ni.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.208 (0.006)	-	-	-
2.88	0.179 (0.00)	13.99 (0.00)	24.05 (0.00)	18.45 (0.00)
5.74	0.168 (0.021)	19.44 (5.33)	31.65* (8.32)	24.27* (6.13)
11.48	0.126* (0.021)	39.79* (10.07)	56.96* (10.74)	43.68* (8.23)
22.98	0.069* (0.005)	66.69* (2.49)	81.01* (1.79)	62.13* (1.37)
45.94	0.050* (0.014)	76.56* (11.47)	87.34* (7.16)	66.99* (5.49)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 85. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Inh) considerando el peso fresco de la Relación 2 de la mezcla Cd/Ni.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.220 (0.04)	-	-	-
2.88	0.149* (0.018)	32.15* (8.03)	49.73* (9.56)	39.09* (7.52)
5.74	0.091* (0.02)	58.63* (15.02)	75.71* (14.13)	59.52* (11.1)
11.48	0.054* (0.005)	75.32* (2.12)	87.39* (1.3)	68.7* (1.02)
22.98	0.083* (0.021)	62.32* (9.74)	78.55* (7.28)	61.75* (5.72)
45.94	0.078* (0.008)	64.72* (3.61)	80.32* (2.6)	63.14* (2.05)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la Relación 2 de la mezcla Cd/Ni, se pudo evidenciar que la tasa de crecimiento basada en el peso fresco resultó más sensible para las tres menores concentraciones evaluadas (2.88, 5.74 y 11.48 mg/L) ya que se observó mayor inhibición que para el número de frondes. Por el contrario, en las dos mayores concentraciones la tasa fue mayormente inhibida al tener en cuenta el número de frondes. Lo mismo fue observado al analizar el porcentaje de inhibición del rendimiento (%Iy) y el %Inh, donde el efecto tóxico es más severo cuando es basado en el peso fresco para las tres menores concentraciones, mientras que en las dos mayores, los valores de %Iy y %Inh son más altos para número de frondes.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Para esta relación, se observó que el número de frondes decreció a medida que incrementó la concentración de exposición y fue significativamente inhibido en todas las

concentraciones, a excepción de la menor. Por su parte, el número de colonias incrementó significativamente respecto del control en las dos menores concentraciones evaluadas, y fue decreciendo en los tratamientos sucesivos hasta volver al valor del control en la mayor concentración (Tabla 86). Además, las plantas expuestas a las cinco combinaciones de concentraciones presentaron una relación frondes/colonias significativamente inhibida con respecto al control (Tabla 86). Se evidencia de esta forma una clara tendencia a la desintegración de las colonias en todos tratados. La gran mayoría de las plantas expuestas a las mayores concentraciones estaban compuestas por una única fronde.

Tabla 86. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 2 de la mezcla Cd/Ni.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación frondes/colonias
Control	51.5	13	3.96
2.88	42	28.5*	1.47*
5.74	39*	32*	1.21*
11.48	29*	24	1.20*
22.98	19.5*	16	1.21*
45.94	17*	13.5	1.25*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Ni, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 2.88, 5.74 y 11.48 mg/L (Tabla 87). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control. En las plantas expuestas a 2.88 mg/L se observó una inhibición del 35.8%, la cual resultó estadísticamente significativa (test de Student $p < 0.05$) (Tabla 87). Por otra parte, se observó una inhibición del 48% en la concentración de 5.74 mg/L, también siendo esta significativa; mientras que en la mayor concentración evaluada (11.48), se observó la mayor inhibición de esta Relación (57%) (Tabla 87).

Tabla 87. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Cd y Ni)			
	Cnt	2.88	5.74	11.48
Proteínas (mg/ml)	3.29 (0.17)	2.11* (0.11)	1.72* (0.38)	1.40* (0.36)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p < 0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en los mismos tratamientos que para el contenido proteico, es decir las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Ni (Figura 35). En los controles las actividades de la APOX y de la GPOX fueron prácticamente iguales y ligeramente mayores que la de la CAT, que fue la que presentó menor actividad. La actividad de la GPOX y APOX presentó un incremento de sus actividades respecto al control que fue significativa en los tres tratamientos; mientras que la actividad de la CAT fue inhibida en todos los tratamientos (Figura 35). En la menor concentración evaluada (2.56 mg/L), la actividad de la GPOX fue estimulada en un 1500% respecto al control, la de la APOX fue estimulada un 170%, y la de la CAT fue inhibida un 22%; en todos estos casos, menos para la CAT, las diferencias fueron significativas respecto al control (ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)) (Figura 35). En la siguiente concentración (5.12 mg/L) la inhibición de la actividad de la CAT fue un poco mayor (30%) pero sin ser tampoco significativa, mientras que las actividades de GPOX y APOX fueron también estimuladas significativamente (1350 y 330 %, respectivamente). En la mayor concentración evaluada (10.25 mg/L) la CAT mostró una inhibición mayor a la mostrada en las concentraciones anteriores (70%), siendo en este caso una diferencia significativa; por su parte, la actividad de la GPOX y APOX también fue estimulada significativamente en esta concentración (950 y 460 %, respectivamente) (Figura 35).

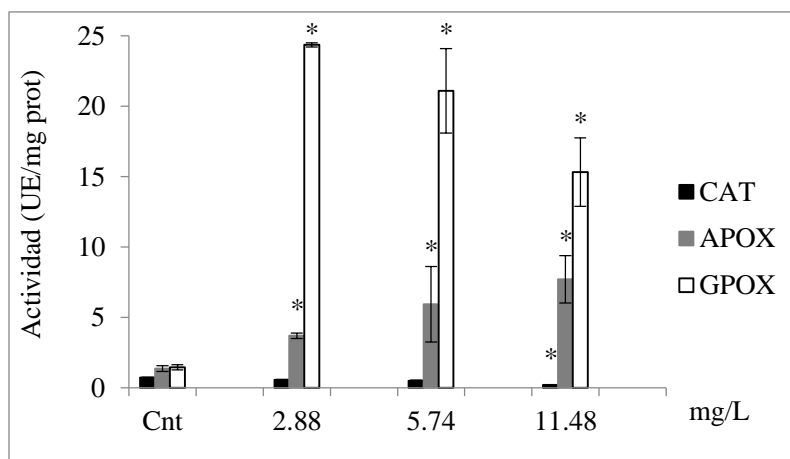


Figura 35. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a en la mezcla 0.5 Cd-0.5 Ni. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Efectos de la Relación 3 sobre el crecimiento

Las cinco combinaciones de las concentraciones de los metales correspondientes a esta relación, se indican en la siguiente tabla, correspondiendo a concentraciones determinadas analíticamente.

Tabla 88. Concentraciones iniciales medidas de cada metal en cada combinación de la Relación 3 de la mezcla Cd/Ni y la suma de las concentraciones de ambos metales.

Concentración Cd (mg/L)	Concentración Ni (mg/L)	Sumatoria de concentraciones
0.33	0.67	
27.62	4.49	32.11
13.81	2.25	16.06
6.91	1.12	8.03
3.45	0.56	4.01
1.73	0.28	2.01

Las tasas de crecimiento estimadas en base al número de frondes de las plantas expuestas a las diferentes combinaciones de concentraciones fueron menores que la tasa del control mostrando diferencias significativas en las dos mayores concentraciones (Tabla 89). Para

este parámetro, los cinco tratamientos evaluados mostraron un rango de porcentaje de inhibición de μ (% Ir) entre 14.17 y 76.08 % que resultaron significativas en las dos mayores concentraciones (Tabla 89). La inhibición de productividad (% Iy) resultó significativa en las tres mayores concentraciones, y mostró un máximo de inhibición del 87.34% (Tabla 89). En concordancia, la variable de respuesta porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inh) presentó un rango de respuesta entre 18.45 y 66.99 % siendo también significativa para las tres mayores combinaciones evaluadas (Tabla 89).

Para el caso de μ calculada en base al peso fresco, los valores de todos los tratados fueron menores que el control, siendo todas las concentraciones inhibidas significativamente respecto al control, a excepción de la menor (Tabla 90). El rango de inhibición de μ (% Ir) para este parámetro fue de 24.74 a 76.84 %, siendo significativo para las cuatro mayores concentraciones (Tabla 90). Por su parte, la inhibición de la productividad (% Iy) llegó a un máximo de 88.32% y fue significativa en todos los tratamientos (Tabla 90). La variable de respuesta %Inh, estimada en base al peso fresco, presentó valores entre 31.10 y 69.43 %, siendo también esta variable de respuesta inhibida significativa para todas las concentraciones evaluadas (Tabla 90).

Tabla 89. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el número de frondes de la Relación 3 de la mezcla Cd/Ni.

SUMA	μ	% Ir	% Iy	% Inh
Control	0.208 (0.006)	-	-	-
2.01	0.179 (0.014)	14.17 (4.15)	24.05 (7.04)	18.45 (5.23)
4.01	0,163 (0.035)	22.82 (6.7)	35.44 (10.2)	27.18 (7.8)
8.03	0.155 (0.009)	25.60 (4.1)	40.50* (5.37)	31.06* (4.11)
16.06	0.140* (0.019)	32.97* (9.12)	49.36* (10.74)	37.86* (8.23)
32.12	0.050* (0.00)	76.08* (0.00)	87.34* (0.00)	66.99* (0.00)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Tabla 90. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando el peso fresco de la Relación 3 de la mezcla Cd/Ni.

SUMA	μ	% I _r	% I _y	% Inh
Control	0.220 (0.04)	-	-	-
2.01	0.166 (0.023)	24.74 (7.16)	40.35* (11.13)	31.10* (9.1)
4.01	0.108* (0.03)	50.89* (14.94)	69.18* (20.11)	54.38* (15.8)
8.03	0.089* (0.02)	59.51* (13.84)	76.40* (10.76)	60.06* (8.46)
16.06	0.097* (0.025)	56.16* (13.81)	73.71* (11.30)	57.95* (8.88)
32.12	0.051* (0.006)	76.84* (2.54)	88.32* (1.52)	69.43* (1.19)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

() Desvío estándar

Comparación entre las variables de respuesta estudiadas relacionadas con la acción sobre el crecimiento

Al analizar la Relación 3 de la mezcla Cd/Ni, se pudo evidenciar que para la tasa de crecimiento, el parámetro de medición peso fresco resultó más sensible que el número de frondes en todas las concentraciones, aunque en la mayor, el porcentaje de inhibición de las tasas calculadas en base a estos dos parámetros de medición se equiparan. Al analizar el porcentaje de inhibición del rendimiento (% Iy) y el porcentaje de inhibición (%Inh) se observó también que las inhibiciones fueron mayores para peso fresco en todas las concentraciones; para estas dos variables de respuesta, cuando estuvieron calculadas en base al peso fresco, se observó inhibición significativa en todas las concentraciones, mientras que cuando estuvieron calculadas en base al número de frondes, no se observó diferencia significativa en las dos menores concentraciones.

Efectos sobre la relación frondes/colonias

Para esta relación, se observó que el número de frondes decreció a medida que incrementó la concentración de exposición y fue significativamente inhibido en las tres mayores

concentraciones. Por su parte, el número de colonias incrementó significativamente respecto del control en las cuatro menores concentraciones evaluadas, pero fue similar al control en la mayor concentración (Tabla 91). Además, las plantas expuestas a las cinco combinaciones de concentraciones presentaron una relación frondes/colonias significativamente inhibida con respecto al control (Tabla 91). Se evidencia de esta forma una clara tendencia a la desintegración de las colonias en todos tratados. La gran mayoría de las plantas expuestas a las mayores concentraciones estaban compuestas por una única fronde.

Tabla 91. Relación frondes/colonias de plantas de *Lemna gibba* expuestas a las concentraciones de la Relación 3 de la mezcla Cd/Ni.

Suma	Nº de frondes	Colonias	Relación Frondes/colonias
Control	51.5	13	3.96
2.01	42	29*	1.44*
4.01	37.5	29.5*	1.27*
8.03	35.5*	31*	1.14*
16.06	32*	27*	1.18*
32.12	17*	14.5	1.17*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteínas en las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Ni, es decir aquellas cuya suma de concentraciones eran 2.01, 4.01 y 8.03 mg/L (Tabla 92). En todos los tratados el contenido de proteínas fue menor que en el control. Considerando la mezcla Cd/Ni, fue en esta Relación donde se observaron las inhibiciones más grandes del contenido proteico. En las plantas expuestas a 2.01 mg/L se observó una inhibición del 53%, la cual resultó estadísticamente significativa (test de Student $p < 0.05$) (Tabla 92). Por otra parte, se observó una inhibición del 65% en la concentración de 4.01 mg/L, también siendo esta significativa; mientras que en la mayor concentración evaluada (8.03 mg/L), se observó una inhibición similar (66%) (Tabla 92).

Tabla 92. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (suma de concentraciones de Cd y Ni)			
	Cnt	2.01	4.01	8.03
Proteínas (mg/ml)	3.29 (0.17)	1.54* (0.37)	1.15* (0.31)	1.11* (0.29)

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por test de Student $p < 0.05$

() Desvío estándar

Efectos sobre biomarcadores- enzimas del estrés oxidativo

Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron en los mismos tratamientos que para el contenido proteico, es decir las plantas control y expuestas a las tres menores combinaciones de Cd y Ni (Figura 36). En los controles las actividades de la APOX y de la GPOX fueron prácticamente iguales y ligeramente mayores que la de la CAT, que fue la que presentó menor actividad. Para la mezcla Cd/Ni, fue en esta relación donde se observaron las mayores estimulaciones para las tres enzimas. La actividad de la GPOX y APOX presentó un incremento de sus actividades respecto al control que fue significativa en los tres tratamientos; mientras que la actividad de la CAT fue estimulada en la concentración de 3.81 mg/L y fue inhibida en la mayor (Figura 36). En la menor concentración evaluada (1.91 mg/L), la actividad de la GPOX fue estimulada en un 1600% respecto al control, la de la APOX fue estimulada un 300%, y la de la CAT un 10%; para las dos primeras enzimas mencionadas las diferencias fueron significativas respecto al control (ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)) (Figura 36). En la siguiente concentración (3.81 mg/L) la actividad de la CAT fue estimulada en un (34%) sin ser ésta significativa; mientras que las actividades de GPOX y APOX fueron estimuladas significativamente (2280 y 880 %, respectivamente). En la mayor concentración evaluada (7.63 mg/L) la CAT mostró una inhibición del 18%, sin ser tampoco en este caso una diferencia significativa; por su parte, las actividades de la GPOX y APOX también fueron estimuladas significativamente en esta concentración (1590 y 618 %, respectivamente) (Figura 36).

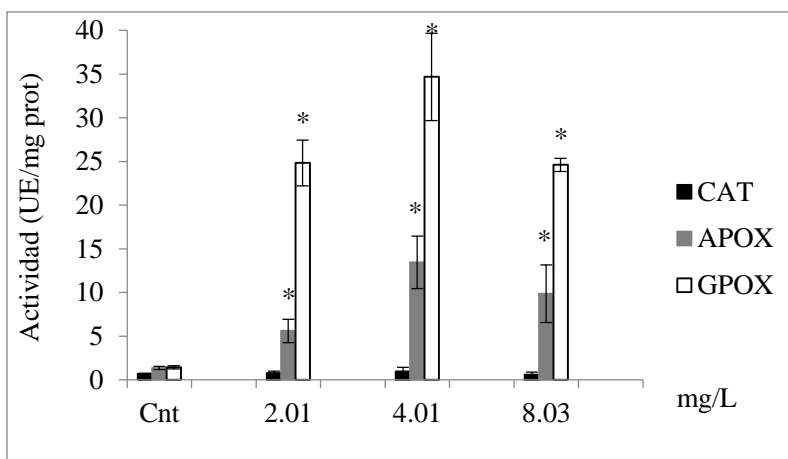


Figura 36. Actividad medida en valores de Unidad Enzimática (UE) en plantas expuestas a en la mezcla 0.33 Cd-0.67 Ni. (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

6.1.2.8 Análisis de la acción de mezclas binarias Cd/Ni sobre los parámetros evaluados

Se observó un alto grado de toxicidad principalmente en las combinaciones de concentraciones más altas para las tres relaciones de Cd-Ni evaluadas. Basándose en las variables de respuesta calculadas, la Relación más tóxica resultó ser la 1, que fue la que contenía las sumas de concentraciones más elevadas, y en la cual el Cd se encontraba en mayor concentración. Por otra parte, la menos tóxica fue la Relación 2 cuando se tuvo en cuenta el peso fresco, ya que el máximo de inhibición de la tasa fue menor al de las restantes Relaciones; aunque para este caso todas las concentraciones provocaron una disminución significativa de la tasa respecto del control, mientras que la menor concentración de la Relación 3 presentó una tasa que no fue inhibida significativamente. Al tener en cuenta el número de frondes, la Relación 2 y la Relación 3, presentaron el mismo rango de efecto sobre el crecimiento de las plantas *L. gibba*.

La relación frondes/colonias resultó severamente modificada en las tres proporciones evaluadas. Éste índice se vio ligeramente más afectado en la Relación 1, aunque en todas las concentraciones de las tres Relaciones, se observó un decrecimiento significativo respecto al control.

El contenido proteico fue afectado por los tratamientos evaluados de las tres proporciones de la mezcla Cd/Ni, ya que se observó un decrecimiento de éste en todos los casos. La

Relación menos afectada resultó ser la 1, donde se observaron los menores porcentajes de inhibición y donde se encontró la única concentración cuyo contenido proteico que no decreció significativamente del control (3.69 mg/L) (Tabla 82). Contrariamente, la más afectada resultó ser la Relación 3, donde todos los tratados evaluados fueron significativamente inhibidos respecto al control (Tabla 92).

En el caso de la segunda mayor concentración de la Relación 3 (suma 16.06 mg/L) se observó una inhibición de la tasa de crecimiento basada en número de frondes del 32.97% (Tabla 89), la cual fue menor respecto de una concentración similar de Ni (1.46 mg Ni/L) evaluada individualmente ya que en este caso las plantas mostraron una inhibición de la tasa del 56% (Tabla 10).

Al evaluarse individualmente una concentración de 33 mg Cd/L, se observó una inhibición de la tasa del 77.3% y del 88.8% para número de frondes y peso fresco respectivamente (Tabla 32), mientras que una concentración similar en mezcla con Ni como en la segunda concentración más grande de la Relación 1 (suma 29.51 mg/L) se observó una inhibición de la tasa del 71.72% (Tabla 79) y del 75.55% (Tabla 80) para número de frondes y peso fresco respectivamente. De esta manera se puede observar también en este caso que la toxicidad de la mezcla fue levemente menor que la causada por los metales individualmente.

Por otro lado, la concentración intermedia de la Relación 2 (suma 11.48 mg/L) que presentaba en su composición una concentración de Ni de 1.02 mg/L produjo en las plantas una inhibición de la tasa basada en el número de frondes 39.79% (Tabla 84); mientras que evaluada individualmente, una concentración similar de Ni (0.92 mg Ni/L) mostró una inhibición de la tasa 43.5 % (Tabla 10). En este caso donde los metales se encontraban en igual proporción, se observó que en las concentraciones evaluadas, para tasa de número de frondes la inhibición en la mezcla fue similar a la del Ni individual o levemente menor.

La concentración de 4.13 mg Cd/L evaluada individualmente produjo una inhibición de la tasa de crecimiento del 23.1% cuando estuvo basada en el número de frondes y del 65.9% cuando estuvo basada en el peso fresco (Tabla 32). Pero cuando una concentración similar de Cd fue evaluada en simultaneo con Ni, como en la segunda concentración más baja de la Relación 3 (3.45 mg Cd/L + 0.56 mg Ni/L), la inhibición de la tasa en base al número de frondes fue del 22.82% (Tabla 89) y del 50.89% cuando fue calculada en base al peso

fresco (Tabla 90). Por lo tanto, la inhibición de la tasa en base al número de frondes se mantuvo en valores semejantes, aun con el agregado de Ni en la solución; mientras que la inhibición de la tasa en base al peso fresco decreció con el agregado de dicha concentración de Ni, es decir resultó menos tóxica.

La actividad enzimática fue afectada en los tratamientos con las mezclas respecto los controles. Al comparar las tres relaciones de la mezcla, se observó que la actividad de las enzimas APOX y GPOX fue estimulada significativamente en todas las mezclas evaluadas, mientras que la CAT fue únicamente estimulada en las dos menores concentraciones de la Relación 3 aunque no significativamente, mientras que fue inhibida en todos los demás tratamientos. Las actividades de las enzimas APOX y GPOX fueron mayormente estimuladas, respecto a los controles, en la Relación 3 (Figura 29). Por su parte fue en la Relación 1 donde estas dos enzimas fueron menos estimuladas. Además en esta Relación se observó la mayor inhibición de la actividad de CAT, la cual fue significativamente disminuida en las tres concentraciones evaluadas (Figura 34). En todos los casos la enzima con mayor estimulación resultó ser la GPOX. En la Relación 1, con mayor proporción de UT de Cd, la actividad de la APOX resultó ser muy similar a la de la GPOX, en cambio, al incrementar las proporción de las UT de Ni (en las Relaciones 2 y 3), la GPOX pasó a tener un mayor incremento de la actividad respecto los controles.

Al comparar la actividad de las enzimas individuales con la de las mezcla se pudieron observar algunas diferencias. Por ejemplo, se observó que la actividad de la enzima CAT en el tratamiento con Ni individual de 0.18 mg Ni/L fue inhibida solo un 10.5% (Figura 18), mientras que en la concentración más baja de la Relación 1 (de suma 3.69 mg/L y que contenía 0.20 mg Ni/L) se observó una mayor inhibición (78%) (Figura 34). Por el contrario, para este caso la actividad de la APOX fue mayormente estimulada en la mezcla (103%) que por el metal individual (55%); mientras que la GPOX también fue más estimulada por la mezcla (137%) que por el metal individual (23%). En concordancia, la actividad de la enzima CAT en el tratado con 0.37 mg Ni/L individual mostró una estimulación no significativa del 29%, mientras que en la concentración de suma 7.38 mg/L de la Relación 1 (conformada por 0.40 mg Ni/L + 6.98 mg Cd/L) esta enzima fue inhibida un 78% respecto al control. Para este caso, la actividad de la APOX fue más estimulada en la mezcla (328%) que bajo la acción del metal individual (130%); esto mismo se observó

para GPOX, ya que fue más estimulada en la mezcla (540%) que por el metal individual (66%). En concordancia con los efectos que han sido descritos en los párrafos anteriores, se puede mencionar que la concentración más baja de la Relación 2, que contenía 2.24 mg Cd/L + 0.32 mg Ni/L, presentó un incremento de la actividad enzimática semejante a cuando el Cd y el Ni fueron evaluados individualmente en concentraciones similares (2.06 mg Cd/L y 0.37 mg Ni) para APOX. Por su parte la actividad de la enzima CAT se mantuvo relativamente constante en los tres casos sin mostrar variación significativa respecto de los controles. Pero para la enzima GPOX, el incremento de la actividad fue mayor en la mezcla que en los tratamientos individuales. Algo similar se observó al comparar la actividad enzimática de la menor concentración de la Relación 3 (que contenía una concentración de 1.73 mg Cd/L y 0.28 mg Ni/L) (Figura 36) con la de concentraciones similares de estos metales evaluadas individualmente (Figuras 26 y 18), donde la actividad enzimática de la CAT fue semejante en todos los casos, pero la de las enzimas APOX y GPOX mostró un incremento mayor en la mezcla que en los individuales.

El aumento de la actividad enzimática observado en general, sobre todo para las enzimas APOX y GPOX, podría significar un beneficio a la planta por el papel que estas desempeñan como antioxidantes eliminando especies reactivas del oxígeno (H_2O_2 en estos casos) las cuales de no ser transformadas en componentes inocuos resultarían en severos daños en la célula, como ha sido descrito previamente. Esta mayor eficiencia del sistema antioxidante podría ser una de las causas explicativas de la toxicidad antagónica observada por parte de esta mezcla, interacción que será detallada en la siguiente sección.

6.1.2.9 Análisis de la interacción Cd/Ni

Los parámetros obtenidos del análisis de regresión múltiple entre la inhibición del número de frondes y las concentraciones de los metales en la mezcla se pueden observar en la tabla 93.

Tabla 93. Análisis de regresión múltiple de los efectos de mezclas binarias de Cd-Ni sobre la inhibición en el número de frondes de *L. gibba*. R del modelo = 0.937

	b	ε	β	sig
Constante	16.927	4.382	--	0.003*
Cd	1.646	0.402	1.389	0.002*
Ni	9.469	3.456	0.710	0.019*
Cd x Ni	-0.346	0.136	-1.153	0.027*

b: coeficientes de regresión

β: coeficientes estandarizados

ε: error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Todas las constantes del modelo de regresión múltiple ajustado fueron significativas con $p < 0.05$ (Tabla 93). Las UT y el promedio obtenido de esta mezcla pueden observarse en la tercera columna de la Tabla 94. Aquí, tanto la sumatoria de las UT para todas las relaciones Cd-Ni, como el promedio dieron mayor a 1, determinando un efecto antagónico o menos que aditivo (Tabla 94). En este caso el CV fue de 76.2% indicando una dispersión menor de los datos comparado con la mezcla Cd-Zn. La dispersión dentro del rango indica que existen valores de $UT > 1$ para diez de doce combinaciones, mientras que $UT \gg 1$ se observan para dos de las mezclas evaluadas (5.46 y 5.14 en Tabla 94). Esto significa que el Ni produce un efecto inhibitorio sobre el número de frondes menor cuando se encuentra formando parte en mezclas con el Cd, que cuando se encuentra en forma individual, siendo más marcado en las dos UT indicadas. Algunos ejemplos que pueden graficar lo mencionado fueron cuando comparamos el porcentaje de inhibición (%Inb) del número de frondes de la mezcla de la Relación 2 con suma 5.74 mg/L (que contenía 0.51 mg Ni/L) con el observado para una concentración similar de Ni evaluada individualmente (0.9 mg/L) donde la inhibición resultó menor en el caso de la mezcla (24% vs 46%) (Tablas 84 y 10, respectivamente). Por otra parte, una concentración similar de Ni se utilizó en la mezcla con suma 4.01 mg/L de la Relación 3, la cual mostró un %Inb del número de frondes del 27% vs el 46% mencionado previamente (Tablas 89 y 10, respectivamente). Además, otra combinación de la Relación 3, con suma 8.03 mg/L (que contenía 1.12 mg Ni/L) produjo un %Inb del número de frondes menor que el observado para la concentración 1.4 mg Ni/L

evaluada individualmente (31% vs 54 %) (Tablas 89 y 10, respectivamente). Algo similar fue observado también en la mezcla de suma 16.06 mg/L de la Relación 3 (que contenía 2.25 mg Ni/L), la cual presentó un %Inb del número de frondes menor que el causado por una concentración similar de Ni (3.6 mg/L) evaluada individualmente (37% vs 63%) (Tablas 89 y 10, respectivamente).

Analizando las UT obtenidas de las diferentes combinaciones de concentraciones de los metales en la mezcla, se puede observar que en algunas de ellas, el efecto protector o menos inhibitorio no sería tan acentuado ya que el valor de inhibición observado fue muy similar al esperado comparando la acción del Ni en la mezcla con la acción del mismo cuando se encuentra en forma individual. Esto pudo observarse para la mezcla con suma 14.76 mg/L (que contenía 0.81 mg Ni/L) de la Relación 1, la cual produjo un porcentaje de inhibición del número de frondes igual a cuando una concentración de 0.9 mg Ni/L fue evaluada individualmente (46% vs 46%) (Tablas 79 y 10, respectivamente). Además, la mezcla con suma 11.48 mg/L (contenía 1.02 mg Ni/L) de la Relación 2, mostró un %Inb del número de frondes similar al observado para una concentración similar de Ni (0.9 mg/L) evaluada individualmente (43.6% vs 46%) (Tablas 84 y 10, respectivamente).

Un efecto antagónico también ha sido señalado por Montvydienė y Marčiulionienė (2007), donde trabajando con *Lepidium sativum* expuesta a combinaciones de $\text{Cr}^{+6}/\text{Ni}^{+2}$ y $\text{Cu}^{+2}/\text{Ni}^{+2}$ se observó supresión de los efectos inhibitorios en el crecimiento de las raíces provocados por el Cr^{+6} y Cu^{+2} individualmente. Se plantea en dicho trabajo que la presencia de cierta concentración de Ni^{+2} podría inducir un mayor grado de vacuolización celular, incrementando de esta forma la habilidad de ésta de reducir los efectos citotóxicos de los metales. En este sentido ha sido planteado que una optimización de la concentración de Ni, como micronutriente vegetal, o una mayor disponibilidad del mismo en los sitios de transporte, resultaría en una reducción en la acumulación de Cd y también en una mitigación de los efectos tóxicos causados por este mediante la estimulación de reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos como la activación de sistemas antioxidantes que mantienen el estado redox de la célula, remueven especies reactivas del oxígeno y mantienen la funcionalidad del sistema fotosintético (Nazar et al. 2012) (Seregin y Kozhevnikova 2006).

Tabla 94. Unidades tóxicas para cada combinación de concentraciones de las mezclas evaluadas. Media (promedio), DE (desvío estándar) y CV (coeficiente de variación).

Σ UT Ni Zn	Σ UT Cd Zn	Σ UT Cd Ni
0.90	0.69	1.49
0.95	0.72	1.59
1.04	0.77	1.63
1.16	0.79	5.46
0.93	0.71	1.46
0.93	0.75	1.54
1.00	0.80	1.64
1.11	6.31	5.14
1.16	0.73	1.43
0.95	0.78	1.49
1.04	0.75	1.58
1.16	4.77	1.63
Media 1.03	1.55	2.17
DE: 0.09	1.89	1.66
CV: 8.89	122.3	76.2

Como hemos mencionado anteriormente, en el presente trabajo se ha observado, en general, un incremento de la capacidad antioxidativa a causa de exposición a la mezcla Cd/Ni respecto a la causada por los metales individualmente; principalmente para las enzimas APOX y GPOX. Por su parte también podría ser considerado un efecto inhibitorio en la incorporación de los metales dentro de la célula, ya que ha sido observado por Jain et al. (2016), que la capacidad adsorbida sobre polvo de girasol fue menor cuando estos metales fueron expuestos juntos que cuando se los expuso individualmente.

El antagonismo observado podría deberse, entre otros motivos, a una interferencia en la incorporación de estos metales dentro de las células de vegetal, ya que ha sido mencionado que la incorporación de Cd y Ni juntos en mezcla mostraron una incorporación reducida en *Spirodela Polyrhiza* comparándose con cuando las plantas fueron expuestas a dichos metales individualmente (Singh et al. 2011).

Toxicidad de las mezclas y parámetros analizados

A partir de las experiencias realizadas con mezclas binarias de los metales estudiados podemos concluir que los efectos sobre el crecimiento, especialmente el número de frondes,

explicaría mejor los efectos de las mezclas que otros indicadores estudiados como la relación frondes – colonias y biomarcadores enzimáticos. Estos últimos no serían indicadores suficientemente robustos para evaluar los efectos fisiológicos de las mezclas de metales por si solos, ya que los metales potencialmente pueden ejercer toxicidad por vías paralelas diferentes a las relacionadas con las enzimas antioxidantes y diferentes metales tienen modos de acción diferente, no solo causando estrés oxidativo sino inhibiendo proteínas determinadas, produciendo cambios en las relaciones hídricas, reducción en la fotosíntesis o disrupciones en el flujo del xilema y floema (de Oliveira et al. 2018; Versieren et al. 2017). De manera que la utilización exclusiva de biomarcadores (como enzimas antioxidantes) no estaría considerando diferentes modos de acción paralelos, y por lo tanto no estarían linealmente asociados a las respuestas observadas, siendo así difícil traducir estos biomarcadores a efectos fisiológicos.

De todas maneras, ha sido mencionado que el uso de biomarcadores asociados al estrés oxidativo resulta de interés en evaluaciones de toxicidades de mezclas de metales (de Oliveira et al. 2018). Así el análisis de varias respuestas en forma integrada permitiría comprender mejor la acción conjunta de los mecanismos subyacentes desencadenados por exposición a metales en forma de mezclas.

6.1.3 Evaluación de mezclas trinarias

En los inicios de los años ochenta, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, sigla en inglés) comenzó a reconocer que la toxicidad de los metales dependía de la interacción con otras sustancias presentes en el agua (USEPA 1985). La unión de metales y protones a sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos) es una problemática de relevancia en muchos ambientes. Se han realizado estudios en laboratorios sobre las interacciones, pero para representar la realidad ambiental, son necesarios modelos químicos capaces de utilizar ese conocimiento (Tipping 1998). El modelado de las interacciones entre sustancias orgánicas e iones ha sido sujeto de interés por varios años (Tipping 1998), aunque un entendimiento completo de la interacción entre metales y materia orgánica natural conlleva un desafío enorme debido a la naturaleza heterogénea de esta última (Paquin et al. 2002).

El contenido del carbono orgánico disuelto (COD), ha sido implementado en diferentes modelos de bioacumulación como en el Modelo del Ligando Biótico (BLM, sigla en inglés) el cual constituye una herramienta para evaluar cuantitativamente la manera en que la química del agua afecta la especiación y biodisponibilidad de los metales pesados en los ecosistemas acuáticos, y el cual asume inhibición competitiva entre cationes, donde diferentes cationes se unen solo al sitio de acción tóxica o ligando biótico, por lo tanto compitiendo con el metal de interés (Gopallapillai et al. 2012). La respuesta toxicológica variará de forma predecible con un correcto entendimiento de la química del ambiente acuático y la fisiología del organismo (Paquin et al. 2002).

En la presente sección, el trabajo se basó en la toxicidad de una mezcla trinararia de metales, considerando concentraciones ambientales, teniéndose en cuenta la biodisponibilidad de los mismos bajo dos situaciones de concentraciones diferentes de carbono orgánico disuelto, el cual puede actuar como ligando flotante. Para tener idea de la concentración de los metales que realmente estuvo biodisponible, se realizó una determinación analítica del contenido de los mismos en tejido vegetal. Debido a la necesidad de un mejor entendimiento en el rol de la biodisponibilidad de los metales en la toxicidad de las mezclas (Gopalapillai and Hale 2015) el objetivo de estas experiencias fue analizar y explorar la relación entre la incorporación en tejido vegetal e interacción de los componentes de dicha mezcla de metales en medio de cultivo con dos concentraciones diferentes de COD. Para lo cual, se evaluó la relación entre la toxicidad de dicha mezcla cuando la concentración de exposición fue basada en concentraciones disueltas (situación en la cual no significa que el 100% de la misma este biodisponible) y cuando fue basada en concentración de metal en tejido, en presencia de ligando orgánico (COD) a dos concentraciones. Además, se planteó conocer si la mezcla trinararia de Ni, Zn y Cd resultaba aditiva en su toxicidad (inhibición del crecimiento de raíces o del número de frondes) para la planta acuática *Lemna gibba* o si se observaban desviaciones de la aditividad que pudieran ser producidas por competencia entre los metales por unirse al ligando biótico, o por interactuar entre ellos mediante una competencia por unirse al mencionado carbono orgánico disuelto (Gopalapillai and Hale 2017). Se utilizó para ello, como en el caso de las mezclas binarias, el concepto adimensional de Unidades Tóxicas (UT) aplicando el modelo de Concentración Aditiva (CA).

6.1.3.1 Mezclas con exposición en medio de cultivo con 0.5 mg/L COD

6.1.3.1.1 Análisis de la toxicidad

Como se explicó en la sección 5.7.2.4 de Materiales y Métodos, para la selección de las concentraciones de cada metal en la mezcla se implementó un diseño compuesto central (CCD, sigla en inglés) por lo que finalmente la batería del ensayo quedó compuesta por controles más 20 casos de combinaciones diferentes de los tres metales. En la siguiente tabla se pueden observar las diferentes combinaciones.

Tabla 95. Composición de las 20 mezclas donde se muestran las concentraciones externas en solución al inicio del ensayo (Ext) y la concentración en tejido vegetal al finalizar el mismo (Ext). Los valores del control se encuentran en la primera fila.

Mezcla	Cd		Ni		Zn	
	Ext ($\mu\text{g/L}$)	Int ($\mu\text{g/g}$)	Ext ($\mu\text{g/L}$)	Int ($\mu\text{g/g}$)	Ext ($\mu\text{g/L}$)	Int ($\mu\text{g/g}$)
Control	0.2	0.22	15.1	1.8	18	216
Mix 1	122	672	106	254	35,9	118
Mix 2	120	678	383	585	35,5	112
Mix 3	116	698	107	254	74,8	276
Mix 4	530	908	106	122	27,2	31
Mix 5	125	711	386	618	128	254
Mix 6	536	883	389	229	26,5	29
Mix 7	547	904	111	80	75,1	50
Mix 8	464	873	376	233	45,5	43
Mix 9	189	850	14	0	32,5	84
Mix 10	297	1304	439	546	53,1	146
Mix 11	147	787	236	230	9,9	28
Mix 12	307	1469	243	378	67,0	55
Mix 13	0	0	247	899	55,2	408
Mix 14	489	948	244	142	42,1	31
Mix 15	188	780	153	238	47,3	128
Mix 16	193	809	156	239	50,8	98
Mix 17	193	824	156	213	49,4	100
Mix 18	193	771	155	235	50,7	93
Mix 19	199	889	158	227	55,2	110
Mix 20	196	822	159	251	49,3	109

Tabla 96. Porcentajes de inhibición basado en número de frondes (%INF) y longitud de raíces (%ICR) de las mezclas trinarias con presencia de 0.5 mg/L COD en medio. Se presentan las concentraciones externas medidas al inicio de los ensayos (Ext) y la concentración interna en tejido de las plantas al cabo de los mismos (Int).

Mezcla	%INF	%ICR
Control	0	0
Mix 1	30.7*	60.7*
Mix 2	24.2*	56.3*
Mix 3	25.3*	62.6*
Mix 4	37.2*	90.8*
Mix 5	23.1*	58.7*
Mix 6	44.8*	89.9*
Mix 7	41.5*	93.4*
Mix 8	30.7*	90.1*
Mix 9	15.5	79*
Mix 10	19.9*	80.7*
Mix 11	28.5*	81.3*
Mix 12	27.4*	84*
Mix 13	26.4*	18.6*
Mix 14	31.8*	93.6*
Mix 15	22*	78.5*
Mix 16	35*	72.6*
Mix 17	39.4*	74*
Mix 18	24.2*	67.8*
Mix 19	32.9*	70.3*
Mix 20	22*	70.3*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Se evidencio efecto sobre el crecimiento en el ensayo de mezclas trinarias, tanto al tener en cuenta el número de frondes como la longitud de las raíces (Tabla 96). En dicha tabla la primera fila corresponde a los controles, con un 0% de inhibición, para los cuales se incluyen las concentraciones de los metales medidos en el medio control. Además las concentraciones internas (Int) para estos casos, se corresponde al contenido de las plantas expuestas durante los 7 días del tratamiento al mencionado medio de cultivo control. Se observó una inhibición significativa en el número de frondes para todas las combinaciones de concentraciones evaluadas, a excepción de la mezcla 9, la cual contenía en el medio de cultivo inicial 189, 14 y 32.5 $\mu\text{g/L}$ de Cd, Ni y Zn respectivamente; ésta presentó la menor

inhibición observada (15.5%) (Tabla 95). Por otro lado para el caso de porcentaje de inhibición basado en la longitud de raíces (%ICR) todas las combinaciones resultaron significativamente inhibidas respecto al control (Tabla 96). Para todas las mezclas evaluadas, el %ICR fue mayor que el %INF, menos para la mezcla formada por 0, 247 y 55.2 µg/L de Cd, Ni y Zn respectivamente. Las respuestas para %INF, presentaron un rango de 15.5 a 44.8 %. Mientras que las respuestas para %ICR, un rango de 18.6 a 93.6 %. Estos rangos brindan una idea de la sensibilidad de ambos parámetros. Además, considerando que para %ICR todas las combinaciones, menos una, produjeron una inhibición mayor al 50%, se puede concluir que el número de frondes fue menos afectado por las concentraciones evaluadas que la longitud de raíces, la cual resultó la variable de medición más sensible.

6.1.3.2 Mezclas con exposición en medio de cultivo con 10 mg/L COD

6.1.3.2.1 Análisis de la toxicidad

En la siguiente tabla se muestra la concentración de cada metal para la batería completa del ensayo con 10 mg/L de COD, que incluyó el control y 20 casos de combinaciones diferentes.

Se evidencio efecto sobre el crecimiento en el ensayo de mezclas trinarias, tanto al tener en cuenta el número de frondes como la longitud de las raíces (Tabla 98). La primera fila de dicha tabla corresponde a los controles. Se observó una inhibición significativa en el porcentaje de inhibición del número de frondes y del crecimiento de las raíces para todas las combinaciones de concentraciones evaluadas (Tabla 98). Para todas las mezclas evaluadas, el %ICR fue mayor que el %INF, menos para la mezcla formada por 0, 256 y 97.4 µg/L de Cd, Ni y Zn respectivamente.

Tabla 97. Composición de las 20 mezclas donde se muestran las concentraciones externas en solución al inicio del ensayo (Ext) y la concentración en tejido vegetal al finalizar el mismo (Ext). Los valores del control se encuentran en la primera fila.

Mezcla	Cd		Ni		Zn	
	Ext (µg/L)	Int (µg/g)	Ext (µg/L)	Int (µg/g)	Ext (µg/L)	Int (µg/g)
Control	0	0	12.9	10.4	19.5	214
Mix 1	144	778	111	222	53,2	143
Mix 2	140	713	361	455	43,9	115
Mix 3	145	734	111	181	157	377
Mix 4	580	978	110	68	45,3	0
Mix 5	148	735	362	473	160	356
Mix 6	605	1007	365	246	47,8	0
Mix 7	567	971	101	73	136	86
Mix 8	607	888	367	206	145	80
Mix 9	366	963	15,7	0	97,6	116
Mix 10	367	891	468	309	89,0	100
Mix 11	360	878	256	179	22,4	0
Mix 12	303	855	249	178	159	180
Mix 13	0	109	256	867	97,4	599
Mix 14	689	934	244	136	89,0	78
Mix 15	222	740	159	151	76,3	95
Mix 16	214	830	154	184	71,6	646
Mix 17	221	778	157	184	75,3	118
Mix 18	218	764	157	167	73,7	113
Mix 19	222	807	157	181	78,2	103
Mix 20	224	742	160	184	78,4	109

Las respuestas para %INF, presentaron un rango de 19.4 a 38 %. Mientras que las respuestas para %ICR, un rango de 19.8 a 95.9 %. En este sentido fue observada una marcada diferencia respecto a ambas variables de respuesta ya que para %INF ninguna de las combinaciones superó el 40% de inhibición, mientras que para %ICR todas, menos una, excedieron el 78%. Resultó por lo tanto, a las concentraciones evaluadas, la longitud de raíces una variable de medición mucho más sensible que el número de frondes.

Tabla 98. Porcentajes de inhibición basado en número de frondes (%INF) y longitud de raíces (%ICR) de las mezclas trinarias con presencia de 10 mg/L COD en medio. Se presentan las concentraciones externas medidas al inicio de los ensayos (Ext) y la concentración interna en tejido de las plantas al cabo de los mismos (Int).

Mezcla	%INF	%ICR
Control	0	0
Mix 1	30.6*	83.8*
Mix 2	29.3*	81.1*
Mix 3	30.6*	78.2*
Mix 4	30.6*	96.6*
Mix 5	19.4*	66.6*
Mix 6	30.6*	92.6*
Mix 7	25.6*	95.8*
Mix 8	30.6*	95.9*
Mix 9	31.8*	90*
Mix 10	31.8*	88.6*
Mix 11	33.1*	91.5*
Mix 12	28.1*	88.6*
Mix 13	28.1*	19.8*
Mix 14	29.3*	95.4*
Mix 15	38*	83.3*
Mix 16	20.7*	83.5*
Mix 17	28.1*	81.7*
Mix 18	25.6*	80.5*
Mix 19	33.1*	81*
Mix 20	23.1*	81.4*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

6.1.3.3 Capacidad de incorporación de Cd, Ni y Zn en exposiciones individuales y mezclas

6.1.3.3.1 Exposiciones con 0.5 mg/L de COD

Al comparar el contenido de los metales en los tejidos de las plantas *L. gibba* expuestas por 7 días, pudo observarse que la concentración interna fue mayor en los tratamientos individuales que en las mezclas para Cd, Ni y Zn. En cuanto a la exposición individual, el Zn fue encontrado en mayor cantidad dentro de las plantas que el resto de los metales, y se observa que es incorporado más rápidamente en concentraciones menores, mientras que en concentraciones mayores se une con la curva del Ni, que no fue tan rápidamente

incorporado en menores concentraciones (Figura 37). Ninguno de estos metales pareciera acercarse al estado de equilibrio en las concentraciones evaluadas ya que las gráficas pareciera que tienen a seguir creciendo. Por su parte, la concentración interna de Cd, parece ir alcanzando un estado estacionario de incorporación, ya que la curva pareciera encontrarse próxima a mostrar un plateau o meseta (Figura 37).

Contrariamente a lo observado en las exposiciones individuales, en la mezcla, el Cd resultó ser el metal con mayor concentración dentro de las plantas alcanzando una meseta en las concentraciones más elevadas (Figura 38). Mientras que la incorporación del Ni y Zn resultó ser menor respecto de cuando se encontraron solos en el medio de cultivo.

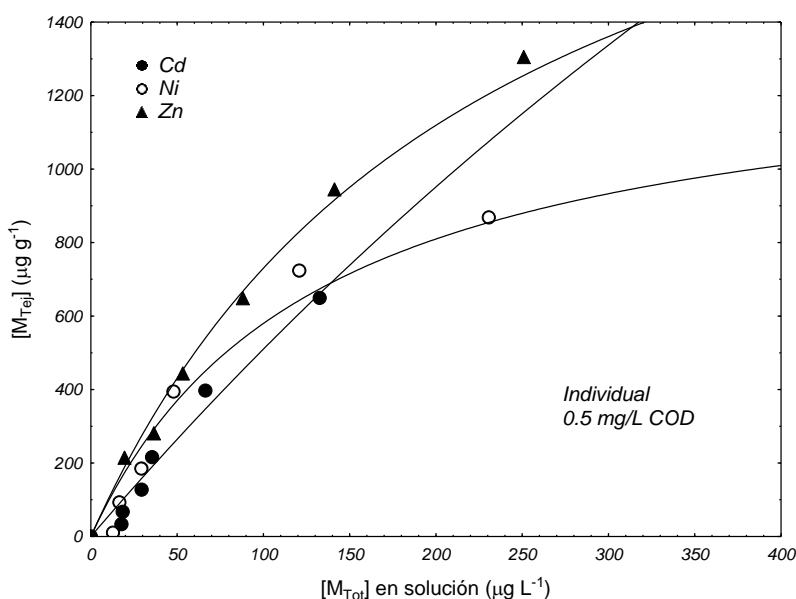


Figura 37. Concentración interna de metales en función de la concentración externa en exposiciones de metales individuales

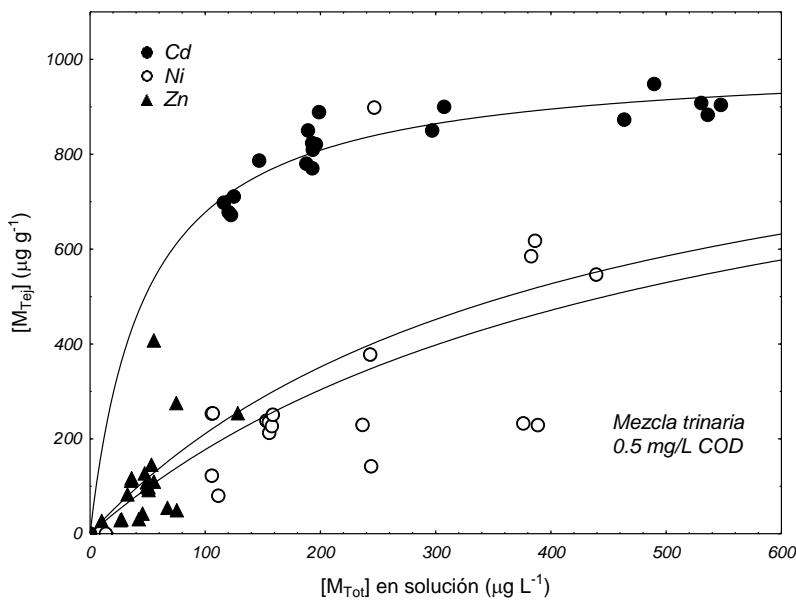


Figura 38. Concentración interna de metales en función de la concentración externa en mezcla trinararia

6.1.3.3.2 Exposiciones con 10 mg/L de COD

Al igual que para las exposiciones con menor concentración de COD, pudo observarse que la concentración interna fue mayor en los tratamientos individuales que en las mezclas para Cd, Ni y Zn. En este caso, en cuanto a las exposiciones individuales el Zn es claramente el que mayor incorporación mostró en las concentraciones evaluadas (Figura 39). En bajas concentraciones el Ni mostró una incorporación similar a la del Zn, pero este metal alcanzó más rápidamente una meseta llegando a un estado máximo de incorporación a menores concentraciones que el Zn. El Cd por su parte, en exposición individual, fue el más lentamente incorporado a menores concentraciones, aunque a medida que la concentración externa incrementó, llegó incluso a superar la concentración interna del Ni. En este caso, al igual que para 0.5 mg COD/L, en la mezcla el Cd resultó ser el metal con mayor incorporación (Figura 40) alcanzando este máximo del metal en la planta en concentraciones externas menores que la necesitada por los demás metales. El Ni y Zn por su parte, también fueron encontrados en menor concentración en las mezclas que en los individuales. Si se comparan las figuras 38 y 40, para mezclas con 0.5 y 10 mg/L de COD

respectivamente, pareciera que la incorporación del Ni y Zn es mayor en el primer caso. Esto no sería extraño ya que es sabido que el COD es un ligando ambiental capaz de complejarse con iones metálicos y así disminuir la biodisponibilidad de los mismos. Mientras que la incorporación del Cd parece ser similar en ambos casos.

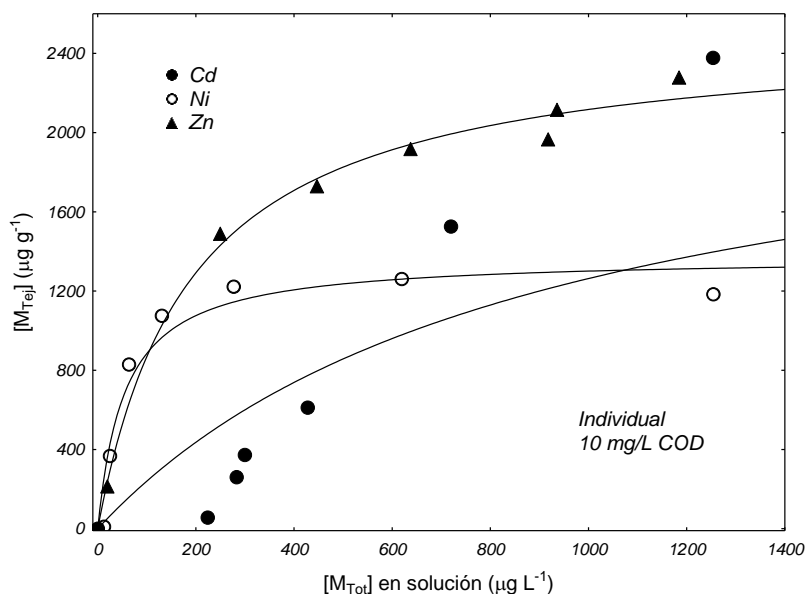


Figura 39. Concentración interna de metales en función de la concentración externa en exposiciones de metales individuales

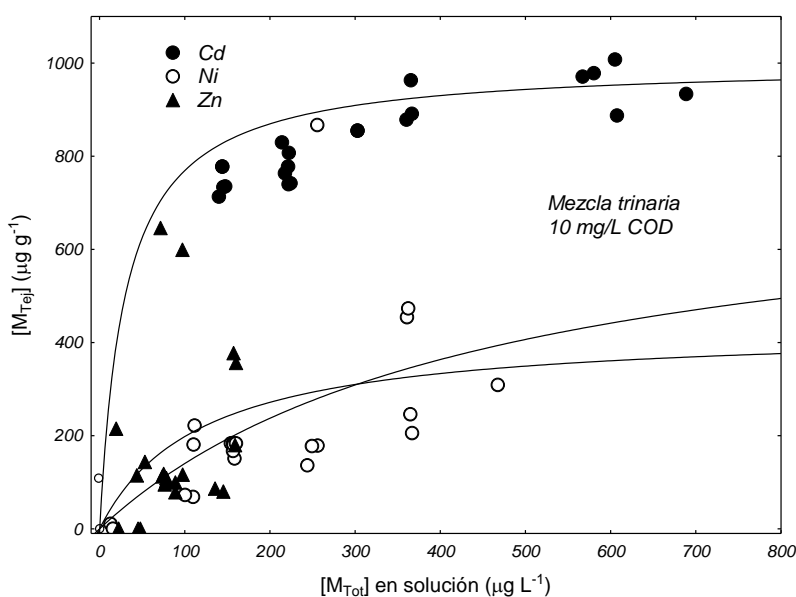


Figura 40. Concentración interna de metales en función de la concentración externa en mezcla trinararia

6.1.3.4 Evaluación de la toxicidad de la mezcla trinary utilizando el modelo de concentración aditiva (CA)

Análisis de regresión múltiple de los efectos de mezclas de Cd, Ni y Zn con presencia de 0.5 mg/L de COD

Al considerar el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces como efecto tóxico cuantificable, se observó que tanto al evaluar en base a la concentración disuelta ($[M_{sol}]$) como en base a la concentración interna en tejido vegetal ($[M_{int}]$), las interacciones entre los metales resultaron antagónicas ya que el promedio de la sumatoria de las Unidades Tóxicas ($\sum TU$) resultó mayor a la unidad en ambos casos, 2.47 y 2.36 respectivamente (Tablas 99 y 100). En el primero de los casos el antagonismo resultó ser levemente mayor, y además el coeficiente de variación entre las distintas combinaciones resultó de 42%, aproximadamente el doble que considerando $[M_{int}]$. Esto se debió principalmente a que con $[M_{sol}]$, algunas combinaciones de concentraciones presentaron $\sum UT$ más elevadas (por ejemplo se observaron $\sum UT$ de 5, 4.1 y 3.8), mientras que para $[M_{int}]$ la combinación con $\sum UT$ más elevada presentó un valor de 3.25. Una razón de lo observado podría deberse a que al tener en cuenta la concentración disuelta en el medio de cultivo, se están considerando las interacciones que los metales pueden presentar al momento de competir por la entrada en las células. En el caso donde se evaluó la concentración disuelta sobre la inhibición del crecimiento de las raíces, se observó que la única interacción entre diferentes metales que presentó un coeficiente de regresión estandarizado (β) diferente de cero fue la de Ni x Zn, lo cual estaría aportando a una toxicidad no aditiva (Tabla 99). Esto se corresponde con las $\sum UT$ de 5, 4.1 y 3.8 mencionadas previamente obtenidas en dicho análisis con $[M_{sol}]$, ya que estas proporciones donde el antagonismo fue más notorio, justamente eran mezclas que contenían concentraciones de Ni y Zn elevadas.

En el caso de la regresión considerando la concentración interna, todas las interacciones binarias (Cd x Ni, Cd x Zn y Ni x Zn) presentaron coeficientes de regresión estandarizados diferentes de cero (Tabla 100). Por su parte en ninguno de estos casos la interacción entre los tres metales resultó significativa por lo que fue excluida del modelo.

Tabla 99. Efectos de la concentración disuelta sobre la inhibición del crecimiento de las raíces de *L. gibba*.

0.5 mg DOC/L - %RGI	$\Sigma TU=2.47$			
	Intercepción	b	β	p
	52,32			<0.001*
Cd		0.287	2.69	<0.001*
Zn		-0.637	-0.88	<0.001*
Cd x Cd		-0.0036	-2.13	<0.001*
Zn x Zn		0.0064	1.26	<0.001*
Ni x Zn		-0.0013	-0.75	<0.001*

b: coeficientes de regresión

 β : coeficientes estandarizados ϵ : error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Tabla 100. Efectos de la concentración interna sobre la inhibición del crecimiento de las raíces de *L. gibba*.

0.5 mg DOC/L - %RGI	$\Sigma TU=2.36$			
	Intercepción	b	β	p
	-9.52			0.7
Cd		0.21	3.32	<0.001*
Ni		-0.12	-1.44	0.017*
Cd x Cd		-0.0001	-2.45	<0.001*
Zn x Zn		0.00039	0.88	0.0017*
Cd x Ni		0.00011	1.07	0.04*
Cd x Zn		-0.00032	-0.98	<0.001*
Ni x Zn		0.00019	0.90	0.015*

b: coeficientes de regresión

 β : coeficientes estandarizados ϵ : error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Al considerar el porcentaje de inhibición del número de frondes como efecto tóxico cuantificable, se observó que al evaluar en base a la concentración disuelta en solución ($[M_{sol}]$), el promedio de Unidades Tóxicas fue cercano a la unidad ($\Sigma TU=1.15$) (Tabla 101). En este caso se observó un coeficiente de variación relativamente bajo (33%) ya que

todas las combinaciones presentaron UT cercanas a 1, incluso algunas mostraron un leve sinergismo (por ejemplo la menor fue de $UT=0.7$). Esta combinación donde la UT fue de 0.7, resultó ser la combinación en la que el Zn se encontró en mayor concentración. Lo observado en dicha combinación podría estar representando un efecto sinérgico de la mezcla incentivado por una concentración elevada de Zn en el medio. En concordancia vale remarcar también que en dicha mezcla (donde la concentración medida de Zn fue de 128 $\mu\text{g/L}$) se observó un $\%INF = 24\%$; mientras que individualmente una concentración de Zn de 141 $\mu\text{g/L}$ un $\%INF = 14\%$. En este caso se observó que las mezclas binarias Cd x Ni y Cd x Zn presentaron coeficientes de regresión significativos y por lo tanto fueron los únicos parámetros que se mantuvieron en el modelo (Tabla 101). Por otro lado, al considerar la concentración interna en tejido como la concentración de exposición, se observó que el promedio de la $\sum TU$ fue de 3.92 (Tabla 102). De esta manera la interacción resultó ser menor que aditiva. En este caso se observó un coeficiente de variación bajo (22%) ya que todas las combinaciones resultaron antagónicas con valores cercanos al promedio. Las dos proporciones donde se observaron las $\sum TU$ mayores (5.75 y 6.22), es decir que el antagonismo fue más notorio, se correspondieron con las mezclas donde el Cd se encontraba en mayor concentración. En este caso la combinación que presentó la interacción menos antagónica mostró una $\sum TU=1.74$, y fue la que contenía la menor concentración de Cd (fue la única con una concentración de 0 mg Cd/L en tejido) y a su vez las mayores concentraciones de Zn y Ni.

Tabla 101. Efectos de la concentración disuelta sobre la inhibición del número de frondes de *L. gibba*.

0.5 mg DOC/L - %FNI	$\sum TU=1.15$			
	Intercepción	b	β	p
	23.15			$<0.001^*$
Cd x Ni		0.00014	0.9	0.001*
Cd x Zn		0.00063	0.66	0.002*

b: coeficientes de regresión

β : coeficientes estandarizados

ε : error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Tabla 102. Efectos de la concentración interna sobre la inhibición del número de frondes de *L. gibba*.

0.5 mg DOC/L - %FNI	$\Sigma TU=3.92$			
	Intercepción	b	β	p
	38.38			<0.001*
Zn		-0.103	-1.16	0.009*
Ni x Ni		-0.00006	-1.34	0.032*
Ni x Zn		0.00022	2.09	0.018*

b: coeficientes de regresión

 β : coeficientes estandarizados ϵ : error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Análisis de regresión múltiple de los efectos de mezclas de Cd, Ni y Zn con presencia de 10 mg/L de COD

Al considerar el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces como efecto tóxico cuantificable, se observó que al evaluar en base a la concentración disuelta ($[M_{sol}]$), el promedio de ΣTU resultó ser de 1.39 y por lo tanto la interacción entre los metales resultó ser ligeramente antagónica. En este caso el coeficiente de variación entre las ΣUT de las distintas concentraciones resultó ser del 65%. Éste valor resultó algo elevado ya que algunas concentraciones presentaron ΣUT menores que la unidad y otras mayores. Se observó una única combinación que mostró una sumatoria de Unidades Tóxicas un poco mayor al resto ($\Sigma UT=3.64$), la cual se corresponde con la mezcla que contenía mayor concentración de Ni. Podría ser que el Ni en mayores concentraciones produzca un mayor antagonismo en la toxicidad de dicha mezcla al analizar la longitud de raíces en *L. gibba*. En este caso, se dejaron incluidos en el modelo dos parámetros que no resultaron significativos (Tabla 103). Esto se debió a efectos de poder realizar los cálculos siendo que la significancia del modelo fue menor a 0.05 y el R^2 ajustado = 0.791, los cuales hicieron concluir en una aceptación del mismo.

Por otra parte, al evaluar en base a la concentración interna ($[M_{int}]$), la interacción resultó aún más antagónica ya que el promedio de ΣTU fue 2.68 (Tabla 104). En este caso se observó un coeficiente de variación más grande 98%, ya que algunas de las combinatorias

presentaron una ΣTU menor que la unidad, aunque en la mayoría de ellas fue mayor que 1. Las que resultaron en ΣTU menores que la unidad coincidieron con las combinaciones menores de concentraciones de los tres metales, sugiriendo que en bajas concentraciones los tres metales ejercería efectos mayores de lo que se observaría en evaluaciones individuales de los mismos.

Tabla 103. Efectos de la concentración disuelta sobre la inhibición del crecimiento de las raíces de *L. gibba*.

10 mg DOC/L - %RGI	$\Sigma TU=1.39$			
	Intercepción	b	β	p
	63.44			0.03*
Cd		0.216	2.5	0.01*
Zn		-0.336	-0.839	0.247
Zn x Zn		0.002	0.835	0.181

b: coeficientes de regresión

β : coeficientes estandarizados

ϵ : error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Tabla 104. Efectos de la concentración interna sobre la inhibición del crecimiento de las raíces de *L. gibba*.

10 mg DOC/L - %RGI	$\Sigma TU= 2.68$			
	Intercepción	b	β	p
	-56.75			0.062
Cd		0.153	1.734	<0.001*
Ni		0.587	6.590	0.002*
Cd x Ni		-0.001	-2.626	0.003*
Cd x Ni x Zn		0.00000035	0.694	0.012*

b: coeficientes de regresión

β : coeficientes estandarizados

ϵ : error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Al considerar el porcentaje de inhibición del número de frondes como efecto tóxico cuantificable, se observó que al evaluar en base a la concentración interna ($[M_{int}]$), el promedio de Unidades Tóxicas fue mayor a la unidad ($\sum TU=2.52$) (Tabla 105). El coeficiente de variación entre las distintas combinaciones de metales fue relativamente pequeño (26%) ya que en todos los casos se detectó antagonismo y todos los valores fueron cercanos al promedio. Al igual que para el caso del análisis de número de frondes frente a la concentración interna en el caso de 0.5 mg COD/L, la combinación donde el antagonismo fue más notorio ($\sum TU=3.93$ en este caso), coincidió con la mezcla que presentó la mayor concentración de Cd. Esto estaría indicando en concentraciones mayores el Cd ejerce menores efectos tóxicos al estar acompañado del Zn y Ni respecto al que causaría estando solo. El modelo, si bien incluye parámetros que resultaron no significativos, tuvo una significancia menor a 0.05.

Por su parte, no pudo realizarse la evaluación teniendo en cuenta los efectos de la concentración disuelta sobre la inhibición del número de frondes ya que no fue posible realizar la regresión múltiple con los datos obtenidos.

Tabla 105. Efectos de la concentración interna sobre la inhibición del número de frondes de *L. gibba*.

10 mg DOC/L - %FNI	$\sum TU= 2.52$			
	Intercepción	b	β	p
	34.07			<0.001*
Ni		-0.001	-0.025	0.943
Cd x Cd		-0.0000046	-0.237	0.490
Cd x Ni		0.0000069	0.135	0.589
Cd x Ni x Zn		0.00000011	-0.825	0.004*

b: coeficientes de regresión

β : coeficientes estandarizados

ϵ : error típico

(*) Niveles de significación menores a 0.05 de las variables dependientes incluidas en el modelo

Análisis integrado

Al tener en cuanta las $\sum TU$ obtenidas en los diferentes casos, en general considerar que se cumple el modelo de Concentración Aditiva en la toxicidad de la mezcla trinary Cd, Ni y

Zn, en las concentraciones evaluadas, en plantas *Lemna gibba*, podría significar sobreestimar los efectos tóxicos ya que en general se observó que el comportamiento fue menor que aditivo independientemente si la dosis de exposición fue la disuelta o la interna y si la variable de medición tomada en cuenta fue %INF o %ICR para ambas concentraciones de COD presente en el medio de cultivo. De todas formas ha sido mencionado que generalmente una ΣTU menor que aditiva con valores entre 1-3 no debería generar preocupación de sobreestimar los efectos de la mezcla por considerar una interacción de adición, lo cual en el presente trabajo se cumple para todos los casos menos cuando se consideró la concentración interna sobre el %INF (Gopalapillai y Hale 2017). Aunque a priori la concentración interna ($[M_{int}]$) parece ser un predictor más confiable del efecto tóxico y por lo tanto más próximo a la aditividad, en el presente trabajo se ha visto que, en las condiciones evaluadas, no resultó en general mejor que al considerar la concentración disuelta. Esto probablemente debido a, como se menciona en Gopalapillai y Hale (2017), que varios factores pueden impactar en la relación lineal con la toxicidad; donde se menciona como ejemplo la interacción con fitoquelatinas que secuestran los iones metálicos y los hacen biológicamente inactivos.

6.2. Evaluación de la acción de metales sobre *Ceratophyllum demersum*

Se realizaron estudios con el fin de evaluar la acción individual del Níquel, Zinc y Cadmio sobre la especie *C. demersum*. Los mismos contemplaron el análisis sobre el crecimiento y biomarcadores. Dentro de los efectos sobre el crecimiento, se determinó peso fresco, longitud del eje principal y longitud total, a partir de los cuales se estimaron distintas variables de respuesta como: tasa de crecimiento específica (μ), porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento específica (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al control (%Inb). Dentro de los biomarcadores, se evaluó la actividad de las enzimas vinculadas al estrés oxidativo, Catalasas (CAT), Ascorbato Peroxidasa (APOX) y Guayacol Peroxidasa (GPOX).

En primer lugar se describirán los resultados obtenidos acerca de la acción del Níquel sobre *C. demersum*, mientras que posteriormente se describirán los resultados obtenidos de la acción del Zinc y del Cadmio.

6.2.1 Efectos del Ni

Efectos sobre el crecimiento

Se pudo evidenciar un efecto sobre el crecimiento para todos los parámetros evaluados a causa de las exposiciones con Ni sobre las plantas de *C. demersum* (Tabla 106). La tasa de crecimiento (μ) estimada en base a la longitud del tallo principal, decreció a medida que incrementó la concentración de exposición llegando a un valor de 0.0019 para la máxima evaluada en este estudio (13.69 mg/L) (Tabla 106). Para este caso las tasas de las tres mayores concentraciones resultaron significativamente diferentes del control. El porcentaje de inhibición de dicha tasa (%Ir) fue en un rango de 14.5 a 61.1%. La tasa de crecimiento basada en el peso fresco, también decreció al aumentar la concentración, aunque la inhibición de la misma llegó a un máximo de 41.3 % para la concentración mayor. En este caso, se observó también para las tasas de las tres mayores concentraciones evaluadas una diferencia significativa respecto al control (Tabla 106). Por otro lado, la tasa de crecimiento basada en la longitud total, resultó ser significativamente menor que la del control para las tres mayores concentraciones. Para este parámetro, el %Ir se encontró en un rango entre 7.85 y 55.39 % (Tabla 106).

El porcentaje de inhibición del rendimiento (%Iy), basándose en la longitud del eje principal, presentó un rango de entre 14.3 a 61.9 %, observándose diferencias significativas respecto al control en las tres mayores concentraciones (Tabla 106). Cuando se evaluó el peso fresco, el rendimiento fue significativamente menor que el control también para las 3 mayores concentraciones, y la máxima inhibición (55.1%) se correspondió con la máxima concentración evaluada. Para la longitud total, al analizar la inhibición del rendimiento, se observó un rango similar que para longitud del eje principal, siendo significativa en las tres mayores concentraciones (Tabla 106).

La variable de respuesta porcentaje de inhibición (%Ihb), resultó ser menos sensible en cuanto a que mostró inhibiciones de menor valor, aunque para la longitud total, este porcentaje de inhibición resultó significativo para las tres mayores concentraciones; mientras que para la longitud del tallo principal, no fue significativo en ninguno de los tratamientos (Tabla 106). Para el caso del peso fresco, al ser calculado en base a las diferencias de peso de las plantas entre el final e inicio de los ensayos, presentó los mismos

porcentajes que el %Iy por lo que no se incluyeron en las tablas para ninguno de los metales.

Trabajando con la misma especie, Chorom et al. (2012) observaron también una inhibición en el crecimiento en un rango de concentraciones similares al de las implementadas aquí (1-6 mg Ni/L), el cual fue determinado mediante la disminución en la producción de biomasa en un rango de 37 a 65 %. Dicha inhibición fue mayor a medida que la concentración en el medio de cultivo se incrementó. La producción de biomasa fue calculada en base al peso fresco como (peso fresco final – peso fresco inicial) / 14 días (Chorom et al. 2012). Al igual que lo observado en el presente trabajo, esas concentraciones no fueron fitotóxicas a las plantas de *C. demersum*, a pesar de la disminución en la biomasa.

Tabla 106. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando Longitud tallo principal (a), Peso fresco (b) y Longitud total (c) de las plantas expuestas a distintas concentraciones de Ni (mg/L).

	Ni mg/L					
	Cnt	0.85	1.71	3.42	6.84	13.69
μ (a)	0.0048	0.0041	0.0041	0.0024*	0.0028*	0.0019*
%I _r (a)		14.5	14.5	49.6*	42.2*	61.1*
%I _y (a)		14.3	14.3	50*	42.9*	61.9*
%Ihb (a)		0.93	0.93	3.27	2.80	4.05
μ (b)	0.022	0.022	0.0178	0.0133*	0.0126*	0.0131*
%I _r (b)		1.80	20.2	40.3*	43.5*	41.3*
%I _y (b)		6.37	37.4*	50*	53.3*	55.1*
μ (c)	0.0122	0.0113	0.0092	0.0064*	0.0060*	0.0055*
%I _r (c)		7.85	25.26	47.71*	51.02*	55.39*
%I _y (c)		10	30	52.5*	57*	60*
%Ihb (c)		1.67	5	8.75*	9.03*	10*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteína de las plantas expuestas a las tres concentraciones más bajas de los ensayos de crecimiento. Se observó un decrecimiento del mismo respecto del control a medida que incrementó la concentración de exposición. Las plantas expuestas a la

menor concentración evaluada mostraron una inhibición de apenas el 6%, la cual no fue significativa (test de Student $p > 0.05$) (Tabla 107). Las dos mayores concentraciones produjeron inhibiciones del 32 y 33 %, resultando significativas en ambos casos (test de Student $p < 0.05$) (Tabla 107).

Tabla 107. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (mg Ni/L)			
	Cnt	0.85	1.71	3.42
Proteínas (mg/ml)	3.32 (0.71)	3.12 (0.74)	2.25* (0.35)	2.21* (0.5)

() Desvío estándar

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por prueba t de Student ($p < 0.05$)

Efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes

Para este metal como para los demás, se evaluó la actividad enzimática en las mismas concentraciones en las cuales se realizaron las mediciones del contenido de proteína, es decir 0.85, 1.71 y 3.42 mg Ni/L. Los gráficos de la actividad de la enzima GPOX, se encuentran separados de los de las otras enzimas para una mejor visualización de los datos por una razón de escalas.

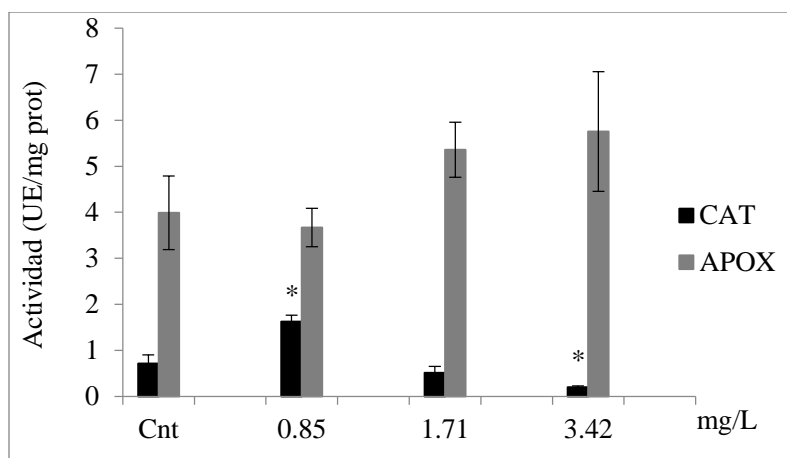


Figura 41. Actividad de CAT y APOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Ni. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

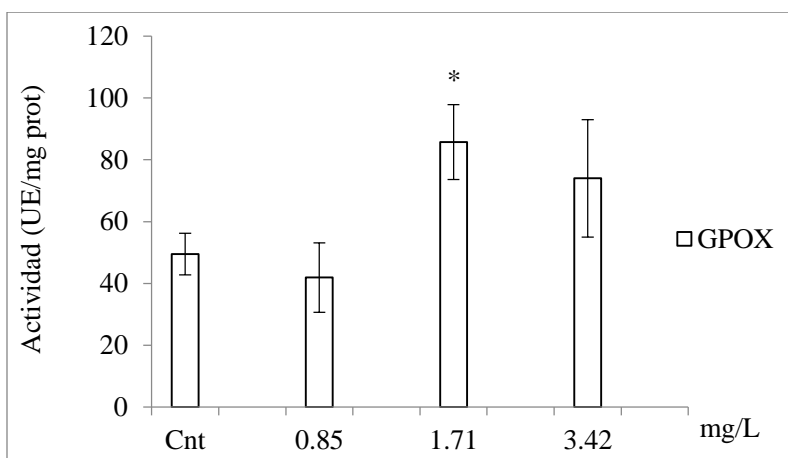


Figura 42. Actividad de GPOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Ni. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Efectos sobre la actividad de CAT

Las plantas expuestas a la menor concentraciones de Ni (0.85 mg/L) presentaron una estimulación significativa (127%) de la actividad de la enzima antioxidante CAT respecto del control (test de Student $p < 0.05$) (Figura 41). En cambio, en las siguientes concentraciones las plantas presentaron una inhibición en la actividad de dicha enzima, la cual no resultó significativa para la concentración 1.71 mg Ni/L, pero si lo fue para la mayor evaluada, que fue inhibida en un 70% respecto del control (Figura 41). En todos los casos, respecto a las otras enzimas, la CAT fue la que menor actividad presentó.

Efectos sobre la actividad de APOX

Las plantas expuestas a la menor concentraciones de Ni (0.85 mg/L) presentaron una actividad de la enzima antioxidante APOX similar a la del control (Figura 41). Por su parte, en las plantas expuestas a las dos mayores concentraciones evaluadas (1.71 y 3.42 mg/L) se observó un incremento de la actividad de dicha enzima respecto al control aunque no resultó significativo en ninguno de los dos casos (test de Student $p > 0.05$) (Figura 41).

Efectos sobre la actividad de GPOX

La enzima antioxidante GPOX fue la que presentó mayor actividad, tanto en los controles como en los tratados (Figura 42). Las plantas expuestas a la menor concentración (0.85 mg/L) presentaron una inhibición del 15% en la actividad de esta enzima, aunque dicha diferencia no resultó significativa respecto del control. La actividad de la GPOX, fue mayormente estimulada respecto del control en la concentración 1.71 mg Ni/L (73%), mostrando una diferencia significativa (test de Student $p < 0.05$) (Figura 42). Por su parte, la mayor concentración de Ni evaluada también mostró un incremento, aunque en este caso no significativo, de la actividad de esta enzima respecto del control.

Evaluación macroscópica de los ejemplares de C. demersum

Además del análisis cuantitativo anteriormente descrito, se llevó a cabo una evaluación macroscópica de los ejemplares de la planta *C. demersum* durante el transcurso de los ensayos de exposición a Ni. Se pudo observar que en general la apariencia de las mismas no se vio afectada por las concentraciones evaluadas. En todos los casos las plantas se mantuvieron verdes con ausencia de clorosis a lo largo del tiempo de exposición. Se pudo apreciar en las concentraciones mayores una mayor pérdida de hojas que en las concentraciones más bajas y controles, aunque sin resultar esto en una apariencia notoriamente afectada.

Estimación de Índices de toxicidad

Se calcularon los índices de toxicidad CE50 (concentración efectiva 50), CENO (máxima concentración evaluada en la cual no se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos controles) y CMEO (mínima concentración evaluada en la cual se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos control) como indicadores de la sensibilidad de los distintos parámetros de medición. El peso fresco fue el único de los parámetros evaluados que mostró una sensibilidad tal que permitió el cálculo de los índices mencionados (Tabla 108). Para esta variable, bajo las condiciones implementadas en los ensayos en el presente trabajo, para el Ni, la EC50 resultó ser de 6.51 mg/L.

Tabla 108. Índices de toxicidad (mg/L) estimados en base a distintos parámetros a los 14 días de exposición de *C. demersum* al Ni. Long EP: longitud eje principal; Pf: peso fresco; Long T: longitud total. Entre paréntesis se indican los límites de los intervalos de confianza del 95 %.

	Long EP	P f	Long T
EC50 14-días	nd	6.51 (4.5-9.2)	nd
CENO	13.69	0.85	13.69
CME0	nd	1.71	nd

6.2.2 Efectos del Zn

Efectos sobre el crecimiento

Se observó un efecto sobre el crecimiento en las plantas expuestas a Zn para los parámetros peso fresco y longitud del tallo principal, mientras que la longitud total no resultó afectada. Se observó que, teniendo en cuenta la longitud del tallo principal, la tasa de crecimiento (μ) decreció a medida que se incrementó la concentración de exposición llegando a ser significativamente menor que el control para las dos mayores concentraciones evaluadas (29.34 y 58.68 mg Zn/L) (Tabla 109). El rango de inhibición de dicha tasa fue de 12.3 a 53.3 %. Por otro lado, la tasa de crecimiento evaluada en base al peso fresco también tuvo una inhibición del tipo dosis-respuesta, llegando a una inhibición máxima del 32.5 % a 58.68 mg/L. Por último, la tasa de crecimiento basada en la longitud total se mostró sin variaciones en los distintos tratados y control (Tabla 109).

Al analizar el rendimiento en base a la longitud del tallo principal, se observó en las distintas concentraciones, una inhibición con respecto al control en un rango entre 12.5 a 50 %, resultado significativa en las dos mayores evaluadas (29.34 y 58.68 mg/L). En cuanto al peso fresco, se observó una inhibición del rendimiento entre 2.32 y 62.14 %. Al evaluar el %Iy basado la longitud total, se observó que ninguna de las concentraciones fue inhibida respecto al control (Tabla 109).

Al igual que para el Ni, la variable de respuesta porcentaje de inhibición (%Ihb), resultó ser menos sensible en cuanto a que mostró inhibiciones de menor valor. Para la longitud del

tallo principal mostró inhibiciones muy pequeñas que no resultaron significativas; mientras que para la longitud total ninguno de los tratamientos resultó inhibido (Tabla 109).

Existen antecedentes bibliográficos que indican que la especie *Ceratophyllum demersum* es moderadamente tolerante al Zn, ya que trabajando con concentraciones de 3 y 9 mg Zn/L, Umebese et al. (2008) observaron un decrecimiento significativo en la tasa de crecimiento relativa respecto a los controles al cabo de 15 días de exposición. En ese mismo trabajo, se determinó una reducción significativa en el contenido de clorofila luego de los 14 días de exposición a 3 y 9 mg/L, y un decrecimiento significativo en la actividad de la nitrato reductasa. En un rango de concentraciones entre 4.55 y 65 mg Zn/L, Doncheva et al. (2001) también encontraron reducción en el contenido de clorofila en *Pisum sativum*, inducida probablemente por alteraciones en la estructura de los cloroplastos que resultaron en una desintegración de lamelas inter-grana, reducción en el número de grana, hinchazón de los tilacoides y desaparición de gránulos de almidón en el estroma. Un decrecimiento del contenido de almidón y azúcares fue observado también en la planta *Citrus reticulata* expuesta a una concentración baja (1.3 mg Zn/L) pero durante un periodo prolongado de 14 semanas (Subba et al. 2014). La eficiente fijación de nitrógeno, actividad en la cual la enzima previamente mencionada nitrato reductasa cumple un papel fundamental, está también en relación con el correcto funcionamiento de los cloroplastos ya que ha sido mencionado que una elevada tasa de asimilación de CO₂ favorece la asimilación del N (Umebese et al. 2008). En este sentido ha sido observado un decrecimiento de la conductancia estomática por tratamiento con 1.3 mg Zn/L en *Citrus reticulata*, como resultado de una disminución en la apertura de las células oclusivas, lo cual reduce la entrada de CO₂ llevando también a una menor actividad de la enzima rubisco (Subba et al. 2014).

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteína de las plantas expuestas a las tres concentraciones más bajas de los ensayos de crecimiento. Se observó que en todos los tratamientos, la concentración de proteína resultó menor que para el control. Las plantas expuestas a la menor concentración evaluada mostraron similar concentración de proteína que el control (Tabla 110). La concentración de 7.33 mg/L produjo la mayor inhibición (17%) aunque no

resultó esta significativa (test de Student $p>0.05$). Por su parte la mayor concentración evaluada mostró una inhibición del 5.6% (Tabla 110).

Tabla 109. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando Longitud tallo principal (a), Peso fresco (b) y Longitud total (c) de las plantas expuestas a distintas concentraciones de Zn (mg/L)

	Zn mg/L					
	Cnt	3.67	7.33	14.67	29.34	58.68
μ (a)	0.0054	0.0047	0.0049	0.0054	0.0033*	0.0025*
%I _r (a)		12.3	10	0	39.1*	53.3*
%I _y (a)		12.5	11.3	0	37.5*	50*
%Ihb (a)		0.93	0.83	0	2.78	3.70
μ (b)	0.027	0.027	0.027	0.025	0.022	0.018*
%I _r (b)		0	0	6.2	16.9	32.5*
%I _y (b)		2.32	10.44	22.84	26.46*	62.14*
μ (c)	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
%I _r (c)		0	0	0	0	0
%I _y (c)		0	0	0	0	0
%Ihb (c)		0	0	0	0	0

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p<0.05$)

Tabla 110. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (mg Zn/L)			
	Cnt	3.67	7.33	14.67
Proteínas	5.31	5.25	4.41	5.01
(mg/ml)	(0.43)	(0.34)	(0.17)	(0.84)

() Desvío estándar

Efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes

Se evaluó la actividad enzimática en las mismas concentraciones en las cuales se realizaron las mediciones del contenido de proteína, es decir 3.67, 7.33 y 14.67 mg Zn/L.

Efectos sobre la actividad de CAT

La actividad de la enzima antioxidante CAT, se mostró levemente inhibida en todas las concentraciones evaluadas, aunque en ninguno de los casos fue significativa respecto del control (prueba t de Student $p > 0.05$). Las inhibiciones observadas fueron del 7.7, 12.2 y 4.4 % para la menor, intermedia y mayor concentración respectivamente (Figura 43).

Efectos sobre la actividad de APOX

La actividad de la APOX fue la única que mostró un incremento significativo de la actividad en alguna de las concentraciones (36% para la concentración 7.33 mg Zn/L) (Figura 43). Por su parte la menor y mayor concentración evaluada, mostraron valores de actividad equivalentes a los presentes en el control.

Efectos sobre la actividad de GPOX

La enzima antioxidante GPOX fue la que presentó mayor actividad, tanto en los controles como en los tratados, aunque en todas las concentraciones se observó una actividad muy similar a la del control, con un incremento del 7% en la mínima concentración evaluada (3.67 mg Zn/L), sin representar esta una diferencia significativa (prueba t de Student $p > 0.05$) (Figura 44). Por su parte las plantas expuestas a las concentraciones de 7.33 y 14.67 mg Zn/L presentaron valores aún más cercanos al control, con un incremento de la actividad solo del 4 y 3 % respectivamente.

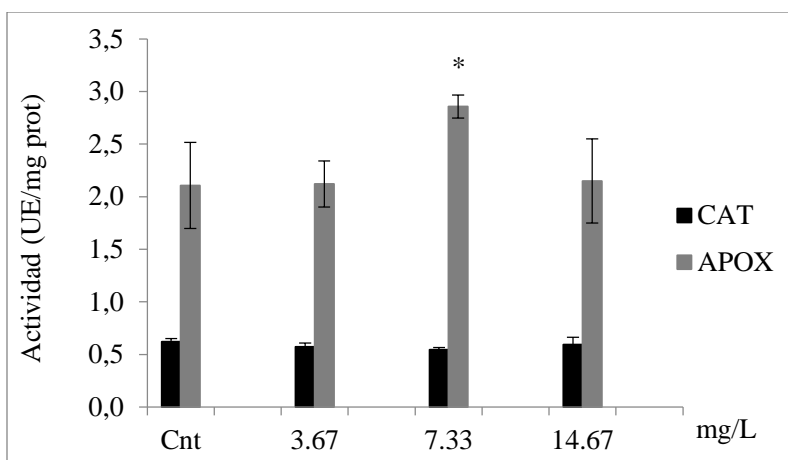


Figura 43. Actividad de CAT y APOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Zn. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

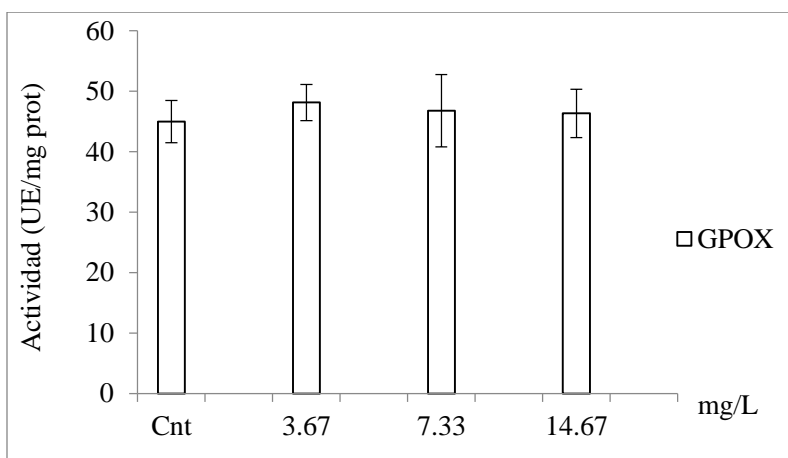


Figura 44. Actividad de GPOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Zn. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Evaluación macroscópica de los ejemplares de C. demersum

Al igual que para los ensayos con Ni, se realizó una evaluación macroscópica de los ejemplares de la planta *C. demersum* durante el transcurso de la exposición a Zn. También para este metal, se pudo observar que en general la apariencia de las mismas no se vio afectada por las concentraciones evaluadas. No se observó clorosis bajo ninguno de las concentraciones evaluadas durante el tiempo de exposición de 14 días, y las plantas mantuvieron el verde característico de los controles. Se pudo apreciar que en las concentraciones mayores ocurrió una mayor pérdida de hojas que en las concentraciones más bajas y controles, aunque si resultar esto en una apariencia notoriamente afectada.

Estimación de Índices de toxicidad

Con el fin de determinar la sensibilidad de los distintos parámetros de medición, se calcularon los mismos índices de toxicidad que para el Ni, es decir CE50, CENO y CMEO. Para el Zn, se observó también que el peso fresco fue el único de los parámetros evaluados que mostró una sensibilidad tal que permitió el cálculo de los índices mencionados (Tabla 111). Para esta variable, bajo las condiciones implementadas en los ensayos en el presente trabajo, para el Zn la EC50 resultó ser de 42.9 mg/L.

Tabla 111. Índices de toxicidad (mg/L) estimados en base a distintos parámetros a los 14 días de exposición de *C. demersum* al Zn. Long EP: longitud eje principal; Pf: peso fresco; Long T: longitud total. Entre paréntesis se indican los límites de los intervalos de confianza del 95 %.

	Long EP	P f	Long T
EC50 14-días	nd	42.9 (29.2-60.7)	nd
CENO	58.68	7.33	58.68
CMEQ	nd	14.67	nd

6.2.3 Efectos del Cadmio

Efectos sobre el crecimiento

Se pudo evidenciar un efecto sobre el crecimiento para todos los parámetros evaluados a causa de las exposiciones con Cd sobre las plantas de *C. demersum* (Tabla 112). La tasa de crecimiento (μ) estimada en base a la longitud del tallo principal, decreció a medida que incrementó la concentración de exposición llegando a ser inhibida en un 100% para la máxima evaluada en este estudio (2 mg/L) (Tabla 112). Para este caso las tasas de las tres mayores concentraciones resultaron significativamente diferentes del control. El porcentaje de inhibición de dicha tasa (%Ir) fue en un rango de 12.5 a 100%. La tasa de crecimiento basada en el peso fresco, también decreció al aumentar la concentración, y la inhibición de la misma también llegó a un máximo del 100 % para la concentración mayor. Las tasas de las plantas expuestas a las tres mayores concentraciones evaluadas presentaron una diferencia significativa respecto al control (Tabla 112). Por otro lado, la tasa de crecimiento basada en la longitud total, resultó ser significativamente menor que la del control para las cuatro mayores concentraciones. Para este parámetro, el %Ir se encontró en un rango entre 4.22 y 100 % (Tabla 112).

El rendimiento también resultó severamente afectado sobre todo en las mayores concentraciones. El porcentaje de inhibición del rendimiento (%Iy), basándose en la longitud del eje principal, presentó un rango de entre 14.2 a 100 %, observándose diferencias significativas respecto al control en las tres mayores concentraciones (Tabla 112). Cuando se evaluó el peso fresco, el rendimiento fue significativamente menor que el

control en todas las concentraciones, y la máxima inhibición (100%) se correspondió con la máxima concentración evaluada. Para la longitud total, al analizar la inhibición del rendimiento, se observó un rango de 2.5 a 100 %, siendo significativa en las cuatro mayores concentraciones (Tabla 112).

Al igual que lo observado para los otros metales, la variable de respuesta porcentaje de inhibición (%Ihb) resultó ser la menos sensible en cuanto a que mostró inhibiciones de menor valor. Al tener en cuenta la longitud del tallo principal, este porcentaje de inhibición resultó significativo para las tres mayores concentraciones llegando a un máximo del 15.7%; mientras que para la longitud total también fue significativo en los tres mayores tratamientos observándose un máximo del 14.7% (Tabla 112).

Tabla 112. Valores de tasa de crecimiento (μ), porcentaje de inhibición de la tasa (%Ir), porcentaje de reducción en rendimiento (%Iy) y porcentaje de inhibición (%Ihb) considerando Longitud tallo principal (a), Peso fresco (b) y Longitud total (c) de las plantas expuestas a distintas concentraciones de Cd (mg/L).

	Cd mg/L					
	Cnt	0.12	0.25	0.5	1	2
μ (a)	0.011	0.010	0.009	0.005*	0.005*	0.000*
%Ir (a)		12.5	23.7	54.5*	54.5*	100*
%Iy (a)		14.2	25.7	60*	60*	100*
%Ihb (a)		2.13	3.83	8.94*	8.94*	15.7*
μ (b)	0.0287	0.0245	0.0236	0.0216*	0.0143*	0.0000*
%Ir (b)		14.7	17.6	24.8*	50.2*	100*
%Iy (b)		33.3*	43.7*	48.1*	66.9*	100*
μ (c)	0.0120	0.0115	0.0073*	0.0048*	0.0048*	0.0000*
%Ir (c)		4.22	38.6*	58.3*	58.3*	100*
%Iy (c)		2.50	29.7*	62.1*	62.1*	100*
%Ihb (c)		0.38	4.64	9.70*	9.70*	14.7*

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

Contenido en Proteínas

Se evaluó el contenido de proteína de las plantas expuestas a las cinco concentraciones más bajas de los ensayos de crecimiento. Se observó que en la menor concentración evaluada, el contenido de proteína disminuyó significativamente respecto del control (prueba t de Student $p < 0.05$), pero la misma comenzó a incrementar respecto de la menor concentración en las concentraciones sucesivas hasta llegar a ser significativamente mayor al control en la concentración 0.5 mg Cd/L (donde mostró un incremento del 15.4%) (Tabla 113). A partir de esta concentración, el contenido de proteína volvió a decrecer hasta la mayor concentración evaluada donde fue significativamente menor que en el control, mostrando una inhibición del 20.4%.

Tabla 113. Contenido de proteínas totales en las plantas control y expuestas.

	Tratamientos (mg Cd/L)					
	Cnt	0.12	0.25	0.5	1	2
Proteínas (mg/ml)	3.57 (0.7)	2.76* (0.5)	3.49 (0.7)	4.12* (0.26)	3.69 (0.9)	2.84* (0.04)

() Desvío estándar

(*) Representa una diferencia significativa respecto al control por prueba t de Student ($p < 0.05$)

Efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes

Se evaluó la actividad enzimática en las mismas concentraciones en las cuales se realizaron las mediciones del contenido de proteína, es decir 0.12, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg Cd/L.

Efectos sobre la actividad de CAT

La actividad de ésta enzima fue la que resultó mayormente incrementada respecto a los controles. Se observó un incremento sucesivo a medida que la concentración del metal fue mayor (Figura 45). Las plantas expuestas a la menor concentraciones de Cd (0.12 mg/L) presentaron una estimulación no significativa de la actividad de la enzima antioxidante CAT respecto del control (test de Student $p > 0.05$). Pero a partir de la siguiente concentración (0.12 mg/L), se observó en todos los tratamiento un incremento significativo de la actividad de dicha enzima (test de Student $p < 0.05$), llegando a un máximo del 1200%

(Figura 45). Andresen et al. (2013) encontraron que *Ceratophyllum* es capaz de tolerar y acumular Cd principalmente debido a la regulación positiva de proteínas capaces de unirse a este metal, como las fitoquelatinas, y también a otros sistemas de detoxificación vinculados a la acción antioxidante. Los autores observaron una disminución de H_2O_2 que atribuyeron al incremento observado en la actividad de la CAT.

Efectos sobre la actividad de APOX

Para esta enzima, el único tratamiento que causó un leve incremento en la actividad fue la menor concentración (0.12 mg/L), el cual fue del 11% sin resultar significativa (test de Student $p > 0.05$). En los demás tratamientos no se observó incremento de la actividad ni ésta fue tampoco significativamente diferente de la del control (Figura 45).

Efectos sobre la actividad de GPOX

Al igual que para la enzima APOX, la actividad de la GPOX en las plantas expuestas a las diferentes concentraciones de Cd se mantuvo similar al tratamiento control (Figura 46). La inhibición principal fue observada en la menor concentración evaluada, aunque fue apenas del 12% y no resultó significativa. Por su parte en el único tratamiento en el que se observó una leve estimulación (13%) fue en la concentración de 0.25 mg/L, la que tampoco resultó significativa.

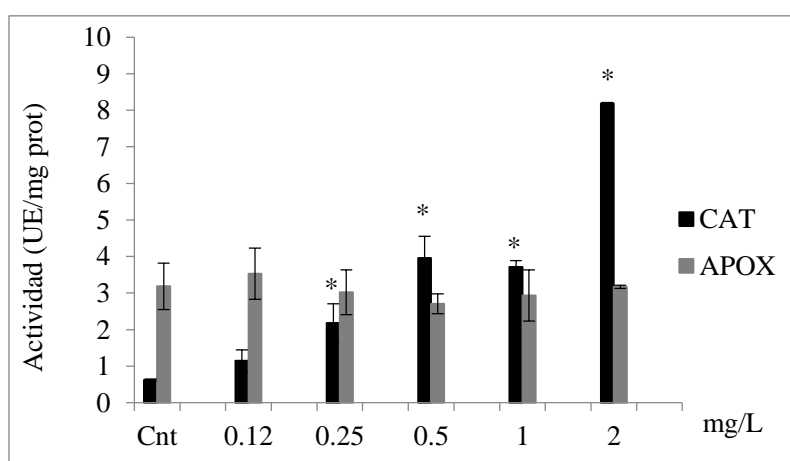


Figura 45. Actividad de CAT y APOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Cd. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

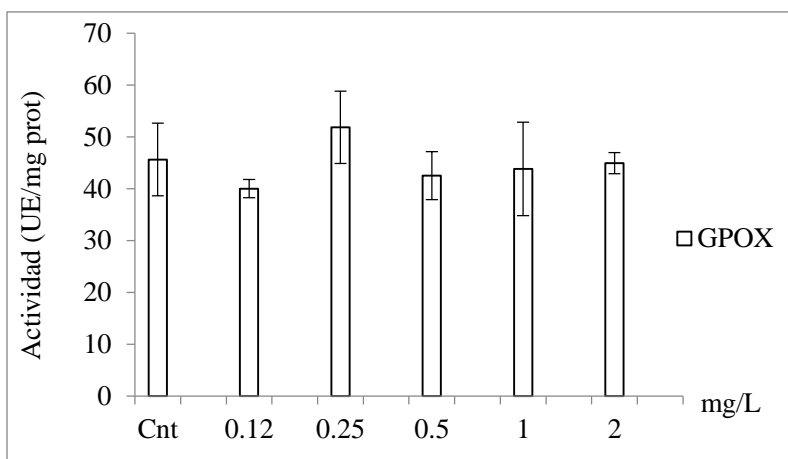


Figura 46. Actividad de GPOX en plantas expuestas a diferentes concentraciones de Cd. UE (Unidad Enzimática). (*) Diferencia significativa con control $p < 0.05$.

Ha sido mencionado que los efectos tóxicos observados por exposición al Cd podrían ser causados por la formación de especies reactivas del oxígeno; la formación de estos EROs puede ser estimulada indirectamente por malfuncionamiento del sistema fotosintético (Andresen et al. 2013). En el presente trabajo la presencia de EROs puede haber sido evidenciada por la significativa estimulación de la actividad de la enzima antioxidante CAT. Dichas especies reactivas del oxígeno, de no ser controladas pueden provocar peroxidación lipídica, causando daño a las membranas celulares lo que es seguido por la fuga de iones.

Como ha sido mencionado en los resultados y discusiones de *Lemna gibba* expuesta a metales individuales, es sabido que el Cd puede afectar la estructura y funcionamiento de enzimas (Sharma y Dietz 2009; Pena et al. 2012). Trabajando también con la especie *C. demersum*, Aravind y Prasad (2004) demostraron que una concentración de 1.12 mg Cd/L, provocó una reducción del 50% en la actividad de la enzima anhidrasa carbónica. La anhidrasa carbónica es una enzima ubicua entre los organismos vivos que cataliza la interconversión reversible entre CO_2 y HCO_3^- y tiene una función activa en organismos fotosintéticos más allá de que ha sido un tópico de interés relacionado a los sistemas acuáticos donde la disponibilidad de CO_2 es menor (siendo HCO_3^- la forma predominante de carbono inorgánico disuelto). En este sentido se ha mencionado en ese trabajo, que la

difusión de HCO_3^- y luego su conversión en CO_2 por parte de la anhidrasa carbónica juega un rol fundamental en el mantenimiento de los niveles de carbono inorgánico en angiospermas acuáticas. Por lo tanto, una disminución en la actividad de dicha enzima conllevaría a una menor disponibilidad de CO_2 para que la enzima rubisco actúe como carboxilasa. Este mismo efecto del Cd sobre la inhibición de la enzima anhidrasa carbónica, en este caso sobre la planta *Thlaspi ferganense*, fue observado por Liu et al. (2008). El Cd puede inhibir muchos procesos dependientes del Zn con relativa facilidad ya que ambos metales poseen una configuración similar por pertenecer al grupo IIB de metales de transición, con ocho electrones en su orbital más externo pudiendo generar cationes divalentes. De esta manera el Cd podría estar interfiriendo con el correcto funcionamiento de la enzima anhidrasa carbónica por desplazamiento del Zn que ésta presenta cerca del sitio activo, el cual tiene un rol catalítico siendo coordinado por los anillos de imidazole de tres histidinas.

Evaluación macroscópica de los ejemplares de C. demersum

Para este metal, se evaluaron inicialmente dos concentraciones mayores a las indicadas en la Tabla 112, la cuales fueron 4 y 8 mg Cd/L. Las plantas expuestas a estas concentraciones no sobrevivieron al período de exposición. Se pudo observar en las plantas de la máxima concentración que finalmente sobrevivieron (2 mg/L), que al cabo de la duración del ensayo, en algunos casos las mismas mostraron una leve clorosis. Además en esta concentración, se observó una notoria pérdida de las hojas que se desprendían de la planta con facilidad. Se observó de esta manera, que las plantas resultaron más delgadas, lo que se corresponde con la significativa disminución observada en la ganancia de peso fresco respecto al control. Las menores concentraciones evaluadas no afectaron la apariencia externa de las plantas. Bunluesin et al. (2004) donde trabajaron con trece macrófitas diferentes, entre las que se encontraron *Ceratophyllum demersum*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* y *Azolla pinnata* entre otras, han mostrado que varias de ellas mostraron síntomas de toxicidad o biomasa reducida cuando crecieron en medio nutritivo Hoagland's al 10% contaminado con Cd entre 1 y 10 mg/L en ensayos de 7 días de duración con un pH de 7.3; siendo un retraso en el crecimiento y clorosis los síntomas más visibles. En estas condiciones para el caso particular de *C. demersum*, similarmente a lo observado en el

presente trabajo, las plantas mostraron cierta clorosis al cabo de 14 días expuestas a 1.25 mg Cd/L.

Estimación de Índices de toxicidad

Se calcularon los índices de toxicidad CE50 (concentración efectiva 50), CENO (máxima concentración evaluada en la cual no se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos controles) y CMEO (mínima concentración evaluada en la cual se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos control) como indicadores de la sensibilidad de los distintos parámetros de medición. El peso fresco fue el único de los parámetros evaluados que mostró una sensibilidad tal que permitió el cálculo de los índices mencionados (Tabla 114). Para esta variable, bajo las condiciones implementadas en los ensayos en el presente trabajo, para el Ni, la EC50 resultó ser de 6.51 mg/L.

Tabla 114. Índices de toxicidad (mg/L) estimados en base a distintos parámetros a los 14 días de exposición de *C. demersum* al Cd. Long EP: longitud eje principal; Pf: peso fresco; Long T: longitud total. Entre paréntesis se indican los límites de los intervalos de confianza del 95 %.

	Long EP	P f	Long T
EC50 14-días	nd	0.42 (0.28-0.61)	nd
CENO	0.25	0.12	1
CMEO	0.5	0.25	2

Comparación de los índices de toxicidad

La siguiente tabla muestra las concentraciones efectivas 50 calculadas en base al peso fresco de *C. demersum* para los tres metales evaluados en este trabajo. El análisis de dicho índice permitió evidenciar una sensibilidad muy diferente para cada uno de los tres metales por parte de esta macrófita. El metal que resultó más tóxico fue el Cd, con una EC50 de 0.42 mg/L siendo aproximadamente 16 veces más tóxico que el Ni, que mostró una EC50 de 6.51 mg/L. El Ni a su vez resultó aproximadamente 6.5 veces más tóxico que el Zn, el

cual presentó una EC50 de 42 mg/L siendo de esta manera el que menor efecto tóxico causó en las condiciones evaluadas.

Tabla 115. Valores expresados en mg/L de las concentraciones efectivas 50 (EC50) para los tres metales individuales calculados en base a la variables de respuesta Peso fresco.

	Cd	Ni	Zn
Peso fresco	0.42	6.51	42.9

6.2.4 Análisis integrado de los parámetros evaluados

Los ensayos realizados permitieron evidenciar los efectos fitotóxicos por parte de los tres metales evaluados individualmente (Ni, Zn y Cd), manifestados por una inhibición del crecimiento cuando se analizó en base las distintas variables de medida utilizadas (longitud del eje principal, peso fresco y longitud total). Como ha sido mencionado y descrito en detalle en la sección de resultados y discusión sobre los efectos de los metales individuales sobre la especie *Lemna gibba*, más allá de cierto umbral los metales pesados pueden provocar una inhibición del crecimiento y otros efectos tóxicos causados por afectar proteínas directamente u otros componentes celulares o interferir en la incorporación de nutrientes esenciales llevando a una limitación de ellos en la planta, entre otras (Andresen et al. 2013). La respuesta tóxica de *C. demersum* a la exposición de los metales fue evidenciada como un aumento en la inhibición del crecimiento a medida que se incrementó la concentración de exposición. Como ha sido mencionado en la sección anterior, el Cd resultó ser el metal más tóxico para esta especie. Esto puede concluirse no solo de la comparación de las efectivas 50 entre los distintos metales, sino que también de las tablas con las distintas variables de respuesta calculadas para cada metal (Tablas 106, 109 y 112 para Ni, Zn y Cd respectivamente) donde es solamente para el Cd donde los porcentajes de inhibición de las tasas y del rendimiento llegan al 100%. Como hemos mencionado en secciones previas, una de las posibles razones de la inhibición del crecimiento por parte del Cd podría deberse a que dicho metal puede afectar enzimas relacionadas a rutas de

asimilación del azufre, el cual es un macronutriente esencial en la nutrición de las plantas (Gallego et al. 2012). Por otra parte ha sido planteado que concentraciones mayores a 1.12 mg Cd/L producen una fuerte reducción en el peso fresco de la planta, posiblemente debido a un decrecimiento de la incorporación de CO₂ producido por una inducción en el cierre estomático (Perfus-Barbeoch et al. 2002). Además se ha sido mencionado la capacidad de los iones Cd²⁺ de reemplazar los iones Ca²⁺ del centro de reacción del fotosistema II, causando una inhibición de la fotoactivación de este fotosistema lo cual tiene efectos drásticos sobre las plantas en cuanto al crecimiento y la obtención de energía (Sharma y Dietz 2009).

Las tasas de crecimiento observadas, incluso en los controles, fueron en todos los casos mayores para el peso fresco. Esto es un indicador que las plantas en las condiciones evaluadas tenían una tendencia a incrementar de peso más que de un crecimiento en longitud.

Al tener en cuenta la acción del Cd sobre la inhibición de las tasas, salvo en la mayor concentración donde se observó un 100% de inhibición en todos los casos, resultaría más afectado el crecimiento del eje principal y el crecimiento total que el basado en el peso fresco. En forma similar, para el Ni la tasa en base al peso fresco mostró menor inhibición que la calculada en base a las longitudes (Tabla 106). Por su parte para el Zn, la tasa calculada en base al crecimiento total, no se vio afectada, mientras que la calculada en base a la longitud del eje principal fue más inhibida que la calculada en base al peso fresco (Tabla 109). Para el Zn, que resultó el metal menos tóxico, ha sido mencionado que una posible causa de la toxicidad observada en plantas sea una influencia negativa en la síntesis de clorofila causada por una deficiencia nutricional como por ejemplo de Fe (Parlak y Yilmaz 2012); lo que va en sintonía con lo propuesto por Radic et al. (2009) de que el Zn se acumula preferentemente en cloroplastos, pudiendo interactuar directamente con las membranas tilacoides y así interferir con el proceso fotosintético.

El contenido proteico fue generalmente menor en los tratamientos de todos los metales respecto a los controles. La máxima inhibición del contenido de proteína fue observado para la mayor concentración de Ni evaluada (3.42 mg/L) la cual fue del 33% (Tabla 107). Precisamente fue en esta concentración donde se observó la única inhibición significativa de la actividad de alguna de las enzimas antioxidantes evaluadas; para este caso la actividad

de la CAT fue inhibida un 72% (Figura 41). Como para los metales en general, la toxicidad del Ni se manifiesta por sus propiedades físicas y químicas que le otorgan la característica de ser capaz de unirse a diferentes grupos funcionales. En el caso particular del Ni, se ha mencionado que tiene particular afinidad por los N que forman parte de anillos aromáticos, mientras que no tiene tanta por los grupos sulfidrilos como otros metales como el Cd; por otra parte su afinidad por la histidina supera a la del Cd, por lo tanto la inhibición de la actividad enzimática a causa del Ni resultaría factible que sea a causa de su interacción con este aminoácido (Seregin y Kozhevnikova 2006). Esto tiene sentido con lo observado respecto a la inhibición de la actividad de la CAT, ya que esta enzima posee una histidina junto con una asparagina que son esenciales del sitio activo (Díaz 2003). Por otra parte estos mismos autores han mencionado que el Ni^{2+} tiene la capacidad de disminuir la concentración de ATP en una célula por inhibición de ATPasas dependientes de Mg^{2+} de la membrana plasmática mediante unión a grupos sulfidrilos o por unión directa al ATP. Por otra parte también se ha demostrado en la planta *Brassica oleracea*, una reducción en el tamaño y número de los cloroplastos, la desorganización de su estructura incluyendo la disminución del número de grana y tilacoides y cambios en la composición lipídica de la membrana de éstos, producto de exposición a Ni; se menciona en ese mismo trabajo que el Ni^{2+} afecta principalmente el fotosistema II, y que se ha encontrado acumulación de Ni predominantemente en las regiones de las lamelas que contienen los complejos enzimáticos correspondientes a dicho fotosistema en *Ocimum basilicum* (Seregin y Kozhevnikova 2006).

6.2.5 Factor de Bioconcentración para cada metal

Se analizó el contenido de metales, a distintos períodos de tiempo, de las plantas expuestas a concentraciones externas constantes de Ni, Zn y Cd. Se evaluaron los factores de bioconcentración para cada tiempo de exposición a Ni, Zn y Cd (Tablas 116, 118 y 120, respectivamente) en base a las concentraciones fijas en solución.

Ensayos de exposición a Ni

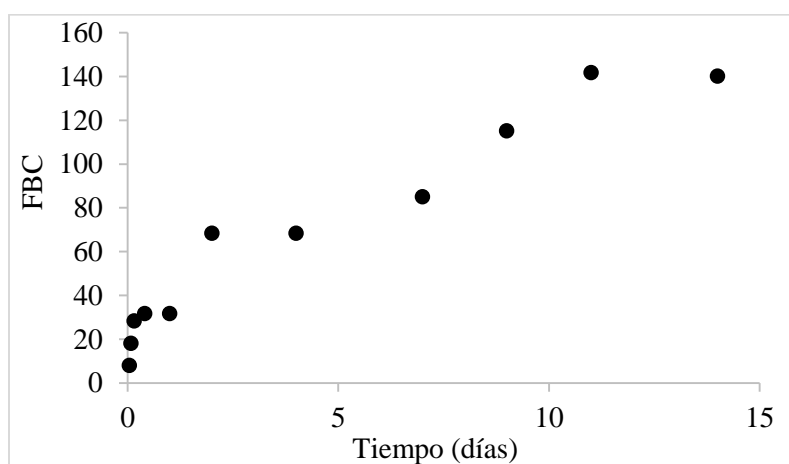
En la siguiente tabla se muestra el factor de bioconcentración (FBC) calculado en los distintos intervalos de tiempo durante la exposición de plantas de la especie *Ceratophyllum demersum* a una concentración constante de Ni de 6 mg/L. Se observó que el contenido de metal en tejido vegetal incrementó a medida que transcurrió el tiempo, hasta hacerse relativamente constante aproximadamente entre los días 11 y 14. Al incrementar la concentración interna de Ni y mantenerse constante la concentración externa, el factor de bioconcentración incrementó hasta un máximo de 142, situación que representa el equilibrio o punto estable aparente donde la concentración del metal en el tejido vegetal permanece constante mientras la exposición continua.

La utilización del FBC, es más significativo para la cuantificación de la acumulación de un metal en tejido vegetal que la cantidad acumulada en la planta ya que provee un índice de la habilidad de dicha planta en la acumulación del metal respecto a la concentración del mismo en el medio (Bunluesin et al. 2004).

En el trabajo de Chorom et al. (2012) se ha evaluado la bioconcentración de Ni en la planta *C. demersum* también a una concentración externa de 6 mg/L. Allí, a diferencia de lo realizado en el presente trabajo, no se llevó a cabo una renovación del medio de cultivo con el metal a fin de mantener una concentración externa constante, ya que el objetivo del mismo fue analizar el decrecimiento de la concentración de Ni en este a lo largo de un período de tiempo también de 14 días. Similarmente a lo descrito en el actual trabajo, ellos observaron que el contenido de metal en el medio decreció hasta aproximadamente el día 13, momento a partir del cual dicha concentración se mantuvo constante debido a que no se observó más remoción de la solución; se calculó que este máximo de remoción para *C. demersum* expuesta a una concentración inicial externa de 6 mg/L fue del 50%, es decir la concentración externa en solución al cabo del periodo de evaluación fue aproximadamente 3 mg/L. En concordancia, en el presente trabajo se observó que la acumulación de Ni en tejido vegetal de *C. demersum*, como puede verse en la tabla 116, alcanzó una concentración máxima constante entre cerca de los días 11 y 14 al mantener una concentración externa constante de 6 mg/L.

Tabla 116. Factor de Bioconcentración para *Ceratophyllum demersum* expuesta a 6 mg Ni/L para distintos tiempos de exposición.

Tiempo (días)	FBC (Conc en tejido/conc en el medio)	mg Ni en tejido
0,04	8	0,05
0,08	18	0,11
0,16	28	0,17
0,41	32	0,19
1	32	0,19
2	68	0,41
4	68	0,41
7	85	0,51
9	115	0,69
11	142	0,85
14	140	0,84

**Figura 47.** Factor de Bioconcentración de plantas expuestas a 6 mg Ni/L en función del tiempo.

La relación encontrada entre la incorporación de cada metal en el tejido vegetal en función del tiempo se ajustó al modelo de cinética de saturación de Michaelis-Menten, que como se indicó previamente en la sección 5.3.8, tiene como expresión:

$$C_M = \frac{\text{Conc max} * T}{k_a + T}$$

El modelo brinda dos parámetros que sirven para estimar el tiempo medio de acumulación (k_a) respecto al máximo acumulable (Conc max).

Se estimó de esta forma la concentración máxima de acumulación (Conc max) y la constante de afinidad (k_a) para el Ni (Tabla 117). El modelo presentó un ajuste con un R^2 de 0.91. La capacidad de máxima de bioconcentración fue estimada en 1.25 mg Ni/g peso seco de planta, mientras que el tiempo en el cual la planta alcanza la mitad de dicho máximo de incorporación fue estimado en 168 horas. En la figura 48 se puede observar la concentración de metal en tejido vegetal observada en función del tiempo y la concentración estimada por el modelo previamente descripto.

Tabla 117. Concentración máxima (mg Ni/g peso seco), constante de afinidad (k_a) (expresada en horas) y el ajuste al modelo de saturación Michaelis-Menten (R^2).

Conc max	1.25
k_a	168
R^2	0.91

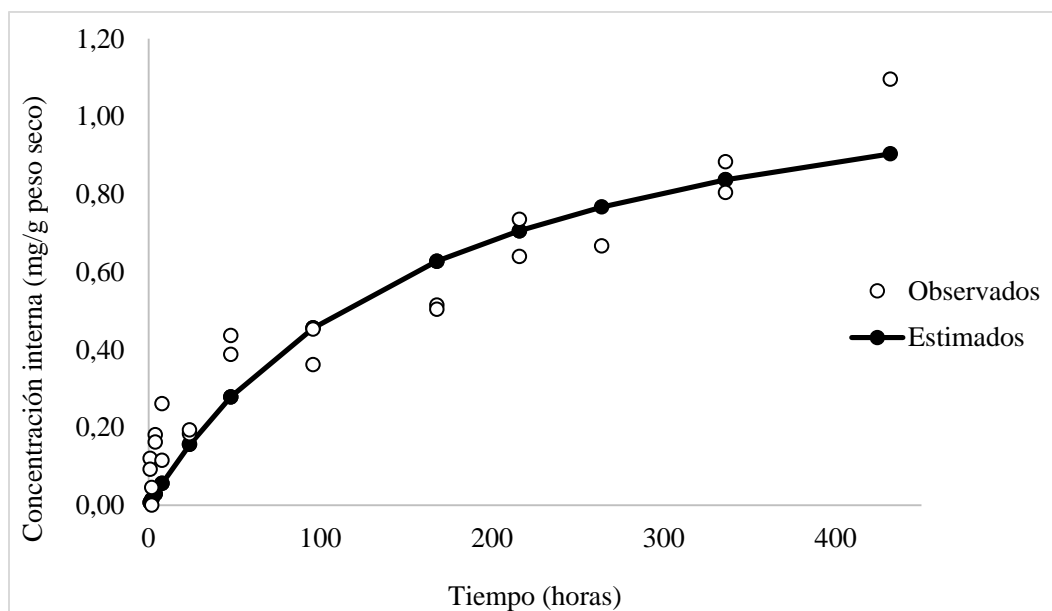


Figura 48. Relación entre incorporación de Ni en el tejido vegetal en función del tiempo ajustado al modelo de cinética de saturación de Michaelis-Menten.

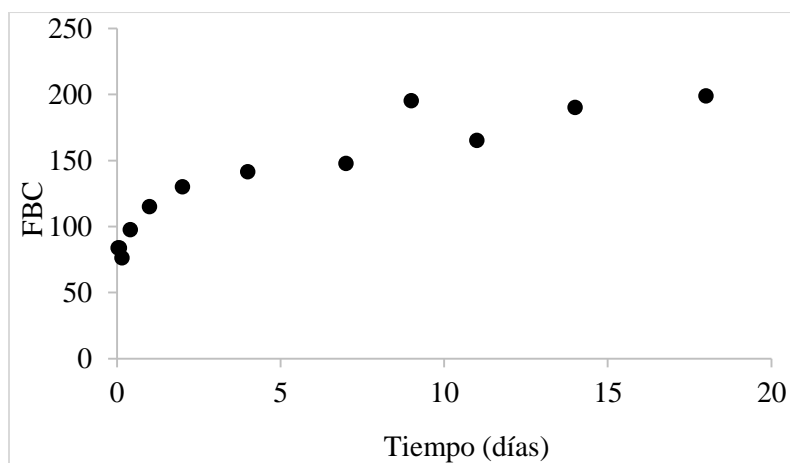
Ensayos de exposición a Zn

En la siguiente tabla se muestra el factor de bioconcentración (FBC) calculado en los distintos intervalos de tiempo durante la exposición de plantas de la especie *Ceratophyllum demersum* a una concentración constante de Zn de 8 mg/L. Se observó que el contenido de metal en tejido vegetal incrementó a medida que transcurrió el tiempo, hasta hacerse relativamente constante cerca del día 9. Al incrementar la concentración interna de Zn y mantenerse constante la concentración externa el factor de bioconcentración incrementó hasta un máximo de 199.

Umebese et al. (2008) han informado que una concentración similar a la implementada en el presente trabajo (9 mg Zn/L) presentó un FBC mayor que el obtenido a una concentración menor (3 mg Zn/L) por parte de *Ceratophyllum demersum* en un periodo de 15 días. En dicho trabajo el FBC para esta especie fue cercano a 140, valor que es relativamente similar al obtenido aquí considerando que las condiciones de experimentación no fueron iguales (Umebese et al. 2008).

Tabla 118. Factor de Bioconcentración para *Ceratophyllum demersum* expuesta a 8 mg Zn/L para distintos tiempos de exposición.

Tiempo (días)	FBC	
	(Conc en tejido/conc en el medio)	mg Zn en tejido
0,04	84	0.67
0,08	84	0.67
0,16	76	0.61
0,41	98	0.78
1	115	0.92
2	130	1.04
4	141	1.13
7	148	1.18
9	195	1.56
11	165	1.32
14	190	1.52
18	199	1.59

**Figura 49.** Factor de Bioconcentración de plantas expuestas a 8 mg Zn/L en función del tiempo.

Al igual que para el Ni, la relación encontrada entre la incorporación de cada metal en el tejido vegetal en función del tiempo se ajustó al modelo de cinética de saturación de Michaelis-Menten.

Se estimó de esta forma la concentración máxima de acumulación (Conc max) y la constante de afinidad (k_a) para el Zn (Tabla 119). El modelo presentó un ajuste con un R^2 de 0.79. La capacidad de máxima de bioconcentración fue estimada en 1.43 mg Zn/g peso seco de planta, mientras que el tiempo en el cual la planta alcanza la mitad de dicho máximo de incorporación fue estimado en 3.85 horas. En la figura 50 se puede observar la concentración de metal en tejido vegetal observada en función del tiempo y la concentración estimada por el modelo previamente descrito.

Tabla 119. Concentración máxima (mg Zn/g peso seco), constante de afinidad (k_a) (expresada en horas) y el ajuste al modelo de saturación Michaelis-Menten (R^2).

Conc max	1.43
k_a	3.85
R^2	0.79

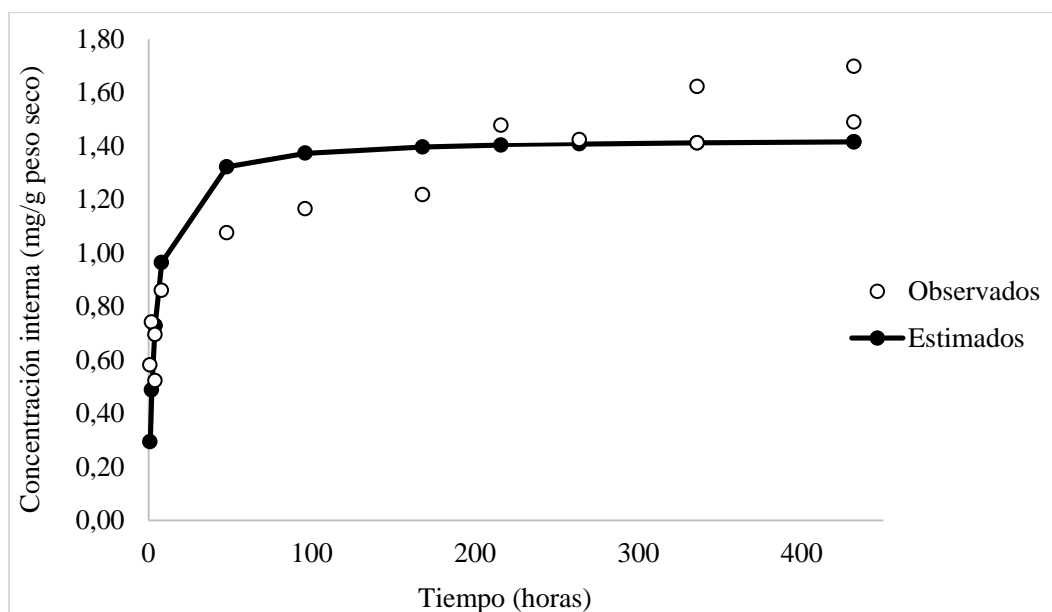


Figura 50. Relación entre incorporación de Zn en el tejido vegetal en función del tiempo ajustado al modelo de cinética de saturación de Michaelis-Menten.

Ensayos de exposición a Cd

En la siguiente tabla se muestra el factor de bioconcentración (FBC) calculado en los distintos intervalos de tiempo durante la exposición de plantas de la especie *Ceratophyllum demersum* a una concentración constante de Cd de 0.5 mg/L. Se observó que el contenido de metal en tejido vegetal incrementó a medida que transcurrió el tiempo, hasta hacerse relativamente constante a partir de aproximadamente entre los días 9 y 11. Al incrementar la concentración interna de Cd y mantenerse constante la concentración externa el factor de bioconcentración incrementó hasta un máximo de 380.

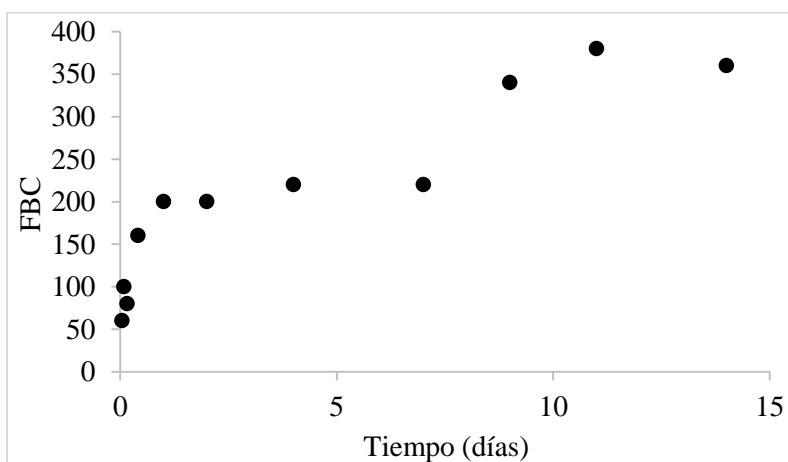
Ha sido mostrado que concentraciones bajas de Cd (entre 0.1 y 1 mg/L) resultaron en FBC mayores respecto al obtenido para una concentración mayor de exposición (10 mg/L) para trece plantas acuáticas diferentes incluyendo *Ceratophyllum demersum* (Bunluesin et al. 2004). Por su parte en Kumar et al. (2003), se observó que la acumulación de Cd en tejido de *C. demersum* incrementó progresivamente por exposición a 0.56 mg Cd/L durante 8 días, mientras que Parnian et al. (2016) observaron una mayor acumulación de este metal por exposición a 2 mg Cd/L que a 4 mg Cd/L. En ambos trabajos, sin embargo, no realizaron una renovación del medio para mantener la concentración externa constante, por lo que vieron que la concentración en este se redujo en un 70 y 82 % al cabo de este período.

La relación encontrada entre la incorporación del Cd en el tejido vegetal en función del tiempo se ajustó al modelo de cinética de saturación de Michaelis-Menten.

Se estimó de esta forma la concentración máxima de acumulación (Conc max) y la constante de afinidad (k_a) para el Cd (Tabla 121). El modelo presentó un ajuste con un R^2 de 0.87. La capacidad de máxima de bioconcentración fue estimada en 0.17 mg Cd/g peso seco de planta, mientras que el tiempo en el cual la planta alcanza la mitad de dicho máximo de incorporación fue estimado en 14 horas.

Tabla 120. Factor de Bioconcentración para *Ceratophyllum demersum* expuesta a 0.5 mg Cd/L para distintos tiempos de exposición.

Tiempo (días)	FBC	mg Cd en tejido
	(Conc en tejido/conc en el medio)	
0,04	60	0,03
0,08	100	0,05
0,16	80	0,04
0,41	160	0,08
1	200	0,1
2	200	0,1
4	220	0,11
7	220	0,11
9	340	0,17
11	380	0,19
14	360	0,18

**Figura 51.** Factor de Bioconcentración de plantas expuestas a 0.5 mg Cd/L en función del tiempo.

En la figura 52 se puede observar la concentración de metal en tejido vegetal observada en función del tiempo y la concentración estimada por el modelo previamente descrito.

Tabla 121. Concentración máxima (mg Cd/g peso seco), constante de afinidad (k_a) (expresada en horas) y el ajuste al modelo de saturación Michaelis-Menten (R^2).

Conc max	0.17
k_a	14
R^2	0.87

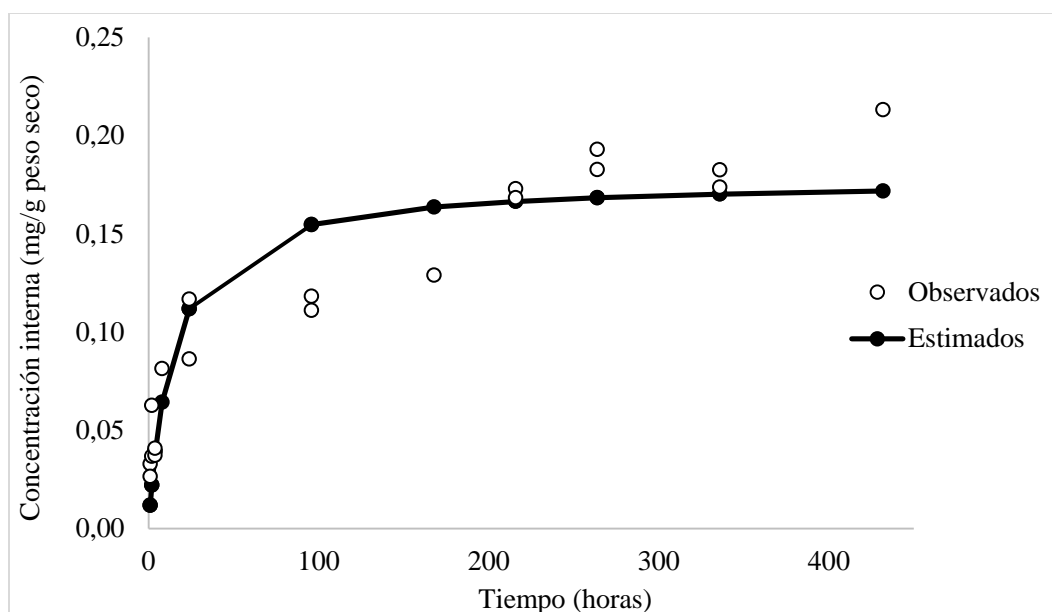


Figura 52. Relación entre incorporación de Cd en el tejido vegetal en función del tiempo ajustado al modelo de cinética de saturación de Michaelis-Menten.

6.2.5.1 Análisis integrado de los ensayos de bioconcentración

El metal que fue acumulado en mayor concentración en el tejido de *C. demersum* fue el Zn, que alcanzó un valor aproximado de 1.59 mg/g peso seco. A partir de aproximadamente el

día 9 dicha concentración se mantuvo relativamente constante por más que la concentración externa siguió siendo renovada diariamente, resultando en el metal que alcanzó el equilibrio más rápidamente. Esto también fue observado tras la modelación con la cinética Michaelis-Menten, donde el k_a obtenido para el Zn fue el menor comparándolo con el de los demás metales, indicando esto una mayor afinidad por parte de la planta. Por el contrario, el metal que fue acumulado en menor medida fue el Cd. Esto no es raro de observar ya que es el único metal que no representa un nutriente vegetal esencial. La concentración interna de este metal alcanzó un valor máximo de 0.19 mg/g peso seco, y alcanzó el punto de equilibrio aproximadamente entre el día 9 y 11, momento a partir del cual esta concentración se mantuvo relativamente constante. Por su parte, la absorción de Ni, llegó a un máximo de aproximadamente 0.85 mg/g peso seco, la cual se alcanzó entre los días 11 y 14.

Se puede concluir que la acumulación por parte de la especie *Ceratophyllum demersum*, bajo las condiciones evaluadas, de los metales Ni, Zn y Cd podría describirse correctamente con la utilización del modelo cinético de saturación Michaelis-Menten. La obtención de las expresiones de los modelos presentados, constituyen una herramienta fundamental para la aplicación de esta macrófita en tecnologías de fitoremediación, ya que el mismo permitirá conocer valores máximos y velocidad de remoción de los metales. Este acercamiento y el conocimiento de la cinética de bioconcentración aplicada a otras macrófitas permitirían la obtención de una batería eficiente en la fitoremediación de metales.

6.3 Comparación de la acción de los metales estudiados sobre las macrófitas utilizadas

Los ensayos ecotoxicológicos y el análisis de los distintos parámetros evaluados en este trabajo mostraron que el Zn fue el metal que mejor fue tolerado por ambas especies de macrófitas. Esto se puede concluir de observar las EC50 calculadas en base al peso fresco (el peso fresco fue el parámetro que se midió en ambas especies) para cada especie ya que son las más altas en ambos casos (Tabla 43 para *Lemna* y Tabla 115 para *Ceratophyllum*). En el caso de *Lemna gibba*, dicha tolerancia podría deberse al incremento significativo de la actividad de la APOX, y el incremento aunque no significativo de la CAT y GPOX. Para

Ceratophyllum demersum, la enzima antioxidante que presentó mayor incremento tras exposición a Zn también fue la APOX. En este sentido ha sido mostrado por Wang et al. (2009), que un tratamiento con Zn incrementó la síntesis de ácido ascórbico en la planta sumergida *Hydrilla verticillata*, lo cual podría ser fundamental en el incremento de la actividad de la enzima APOX observado ya que esta molécula actúa como donadora de electrones en la reducción de H_2O_2 a H_2O catalizado por dicha enzima. Más aún, ha sido reportado que un estrés causado por Zn induce la generación de glutatión (GSH) mediante la mejora en la actividad de la glutatión sintetasa en una alga verde marina (Tsuji et al. 2003). Esto está en concordancia con lo recién mencionado ya que el GSH es fundamental en el reciclado del ácido ascórbico mediante una reacción catalizada por la deshidroascorbato reductasa en el estroma de los cloroplastos generando también glutatión oxidado (GSSG).

Por su parte, al observar las mismas tablas (Tabla 43 para *Lemna* y Tabla 115 para *Ceratophyllum*) se puede concluir que ambas especies resultaron más sensibles al Cd, siendo *C. demersum* aún más sensible que *L. gibba*.

Analizando con más detalle los resultados obtenidos, en la comparación de las efectivas 50 calculadas en base al peso fresco para la especie *Lemna gibba* (Tabla 43) con la de *Ceratophyllum demersum* (Tabla 115), se pudo observar que la primera macrófita mencionada resultó más sensible para el Ni ya que la EC50 fue 1.67 veces menor. Por el contrario, la segunda especie resultó más sensible para los otros dos metales, ya que la EC50 resultó 2.5 veces menor para el Cd y 1.8 veces menor para el Zn. En este sentido se puede mencionar a modo de ejemplo que una concentración de 0.92 mg Ni/L causó una inhibición de la tasa basada en el peso fresco del 38.62% para *L. gibba* (Tabla 10), mientras que una concentración similar (0.85 mg Ni/L) inhibió dicha tasa en solo un 1.8% para *C. demersum* (Tabla 106). Para éste último caso, la actividad de la enzima CAT fue la única que incremento significativamente. Las evaluaciones de bioconcentración para *C. demersum* fueron realizadas con una concentración en solución de 6 mg Ni/L, y estas plantas demostraron bioconcentrar y tolerar el estrés a dicha concentración.

Por otra parte una concentración de 2.06 mg Cd/L causó una inhibición de la tasa basada en el peso fresco del 57.7% para *L. gibba* (Tabla 32), mientras que una concentración similar (2 mg Cd/L) inhibió dicha tasa en un 100% para *C. demersum* (Tabla 112). La especie *C.*

demersum no sobrevivió a exposiciones de 4 mg Cd/L por 14 días, mientras que las plantas de *L. gibba* si sobrevivieron a esta concentración aunque presentando una inhibición significativa respecto de los controles (Tabla 32). A las concentraciones de 1 y 2 mg Cd/L, la enzima antioxidante que presentó mayor incremento en su actividad respecto al control en las plantas de *C. demersum* fue la CAT (Figura 45), siendo esta la única enzima que mostró un incremento ya que en esas concentraciones las demás enzimas fueron levemente inhibidas; mientras que en el caso del *L. gibba*, fueron dos enzimas las que mostraron un incremento significativo en estas concentraciones de Cd (GPOX y APOX) (Figura 26). En el caso del Zn por ejemplo, no se observó un incremento significativo de ninguna enzima antioxidante en la concentración de 3.67 mg/L para *C. demersum* (Figuras 43 y 44), mientras que en *L. gibba* se observó un incremento significativo de la actividad de la APOX en una concentración similar (4.6 mg/L) (Figura 22). Esto podría estar significando una mayor eficiencia de los antioxidantes en la macrófita *L. gibba* ante las exposiciones con Cd y Zn, lo cual le permitiría mejorar la resistencia ante los efectos tóxicos causados por los mismos en dichas concentraciones y presentar una tolerancia mayor respecto de la especie *C. demersum* como la observada en el presente trabajo.

6.4 Experiencias preliminares de aplicación de macrófitas acuáticas en la fitoremediación de metales.

A continuación se presentan los resultados de las experiencias preliminares de fitoremediación llevadas a cabo con tres especies de macrófitas, *L. gibba*, *Spirodela* sp y *C. demmersum*.

Como se explicó en Materiales y Métodos, se implementó un sistema multimetal colocando los tres metales estudiados Ni Zn y Cd juntos, de manera de simular una muestra ambiental correspondiente a un líquido residual o a un efluente artificial. Es de destacar que, si bien la experiencia tuvo una duración total de 10 días, las macrófitas se reemplazaron por nuevos ejemplares a intervalos de tiempo de dos días, cuatro días y cuatro días finales, sin realizar la renovación de la solución multimetal inicial. La renovación de las plantas permitiría mantener esta batería de macrófitas en estado saludable. De esta manera se aumentaría la eficiencia de este sistema para la remoción de metales, ya que las plantas estarían expuestas

a los tres metales en forma simultánea, pudiendo ejercer efectos adversos como producto de la interacción de la toxicidad de los mismos.

En las siguientes fotos se puede observar la implementación del sistema y el aspecto general de las plantas (Figura 53).

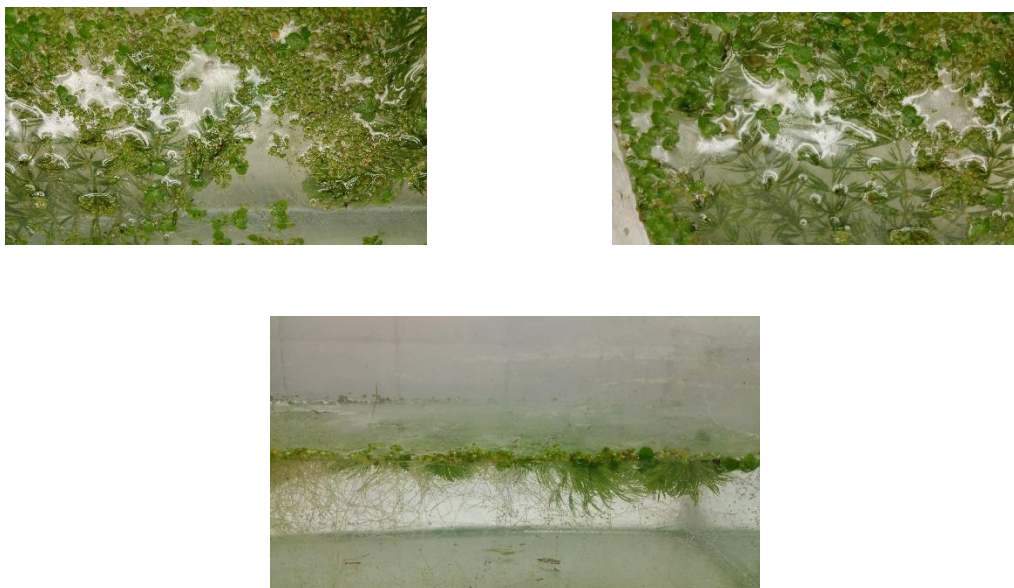


Figura 53. Aspecto general de las plantas y sistema implementado en las experiencias de fitoremediación

Al cabo de los diferentes intervalos de tiempo, siguiendo el cronograma de extracción de las plantas presentado, se determinaron los metales en solución y en el tejido vegetal de cada una de las especies de macrófitas. Se estimó el FBC para cada metal y en cada macrófita, que si bien los resultados se presentan separados por metal para facilitar la comprensión, tanto las plantas como los metales coexistieron en forma simultánea.

El comportamiento de la remoción y bioconcentración de los metales por parte de las macrófitas se observa en las Figuras 54, 55 y 56. Respecto a la remoción del Zn, se observó que fue mayor en los primeros dos días de exposición, resultando en FBC mayores pero similares para las tres especies de macrófitas.

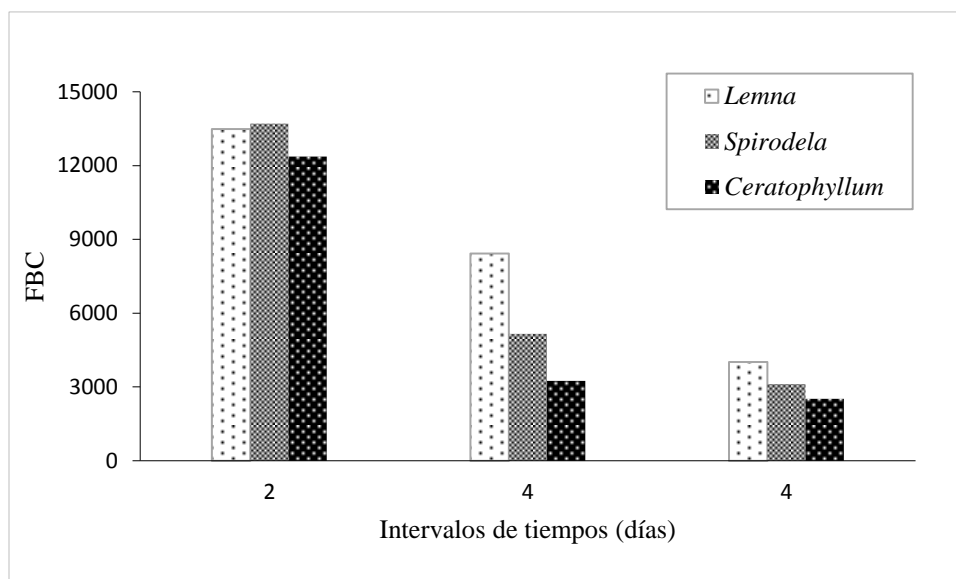


Figura 54. Factores de Bioconcentración de Zn de cada una de las especies en el sistema implementado al cabo de los intervalos de tiempo de renovación de la biomasa vegetal.

Los FBC fueron menores en los dos intervalos siguientes, presentando valores más bajos en los últimos 4 días. En estos intervalos se observó una diferenciación en la FBC de los metales por parte de las macrófitas, siendo mayor la bioconcentración para *Lemna gibba*, seguida de *Spirodela* sp. *C. demersum* fue la especie que presentó un menor FBC en ambos intervalos (Figura 54). La remoción total del Zn por parte de las tres macrófitas en conjunto fue de 79,9 %, ocurriendo la mayor remoción en los dos primeros días (53%) para después mantenerse en valores de 37 y 31% (Tabla 122).

Analizando los resultados obtenidos respecto a la remoción de Ni, se puede observar que al cabo de los tres períodos de tiempo analizados, la bioconcentración del metal fue similar, con un leve incremento en los cuatro días intermedios. Para este metal también la especie *L. gibba* presentó un mayor FBC, acompañado de *Spirodela*. *C. demersum*, si bien bioconcentró Ni de manera importante, se mantuvo por debajo de los niveles de las otras dos macrófitas (Figura 55). La remoción total del Ni por parte de la tres macrófitas fue de 82,2% resultando porcentajes de remoción más elevados en los dos intervalos últimos estudiados, que en los dos primeros días (Tabla 122).

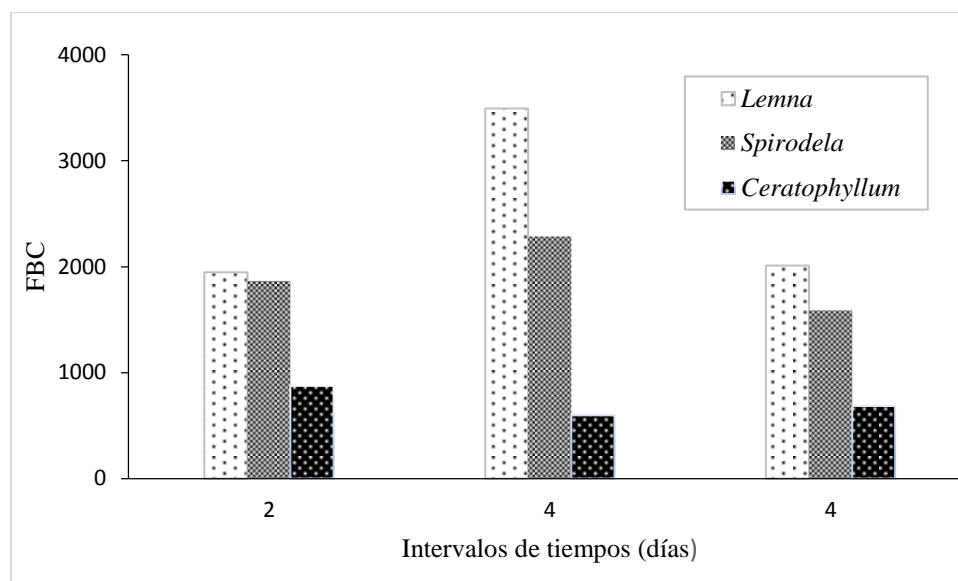


Figura 55. Factores de Bioconcentración de Ni de cada una de las especies en el sistema implementado al cabo de los intervalos de tiempo de renovación de la biomasa vegetal

La remoción de Cd desde el sistema multimetal por parte de las macrófitas se observa en la figura 56. En este caso, la bioconcentración del metal por parte de las macrófitas fue menor en los dos primeros días que en los otros intervalos, siendo mayor en los últimos 4 días del proceso. En este caso tanto *L. gibba* como *Spirodela*, resultaron menos eficientes en la remoción de este metal, mientras que *Ceratophyllum* fue la macrófita que mayor bioconcentró el Cd (Figura 56).

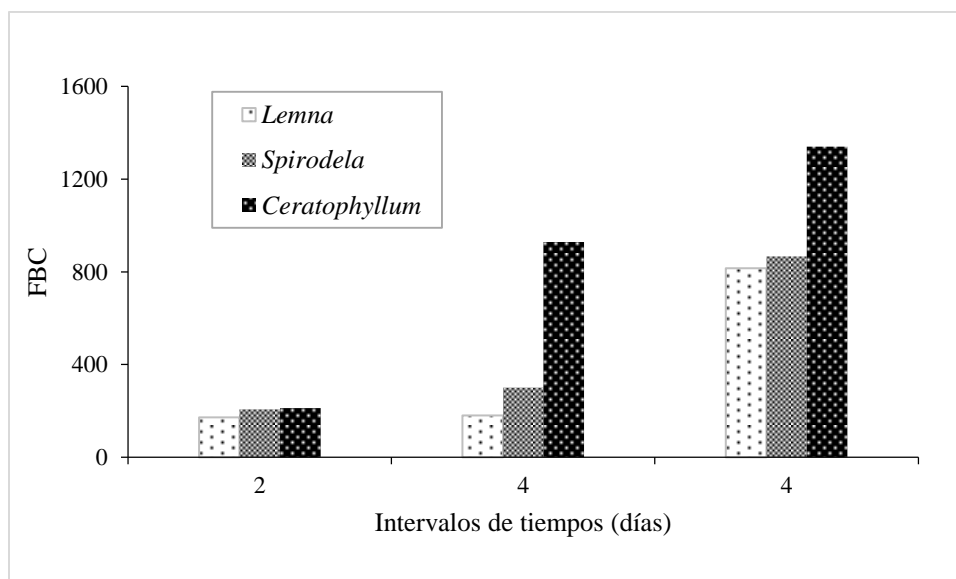


Figura 56. Factores de Bioconcentración de Cd de cada una de las especies en el sistema implementado al cabo de los intervalos de tiempo de renovación de la biomasa vegetal

Este comportamiento podría explicarse por la presencia de mecanismos de detoxificación relacionados a quelantes citoplasmáticos vacuolares como las fitoquelatinas. La exploración de esta hipótesis no se realizó en el presente trabajo, pero se continuará con esta línea de investigación a fin de poder fundamentar el comportamiento diferencial observado respecto de la bioconcentración de este metal.

Respecto a la remoción total del Cd desde el sistema implementado, durante los dos primeros días donde la concentración en el medio fue mayor, la remoción fue escasa, mientras que en los otros dos períodos hubo un incremento del mismo. La remoción total en el sistema implementado para este metal fue de 80% (Tabla 122).

Tabla 122. % Remoción de cada metal en el sistema implementado en los intervalos de tiempo mencionados expresados en días y el % de remoción total

	2	4	4	% R Total
Zn	53,1	37,5	31,0	79,9
Ni	21,5	49,7	55,4	82,2
Cd	5	20	65	80,4

Para comprender con mayor claridad los resultados descriptos, se debe tener presente que la concentración de los metales fue disminuyendo al paso de los días, ya que no se realizó la renovación del medio. Se colocaron las concentraciones iniciales de los metales junto con las macrofitas de manera que el medio presentó concentraciones sucesivamente menores al paso del tiempo. Por su parte, las macrófitas fueron renovadas, de manera que cada grupo a los intervalos descriptos, inicio la incorporación de los metales no siendo acumulativos desde el principio hasta el final del tiempo total.

Considerando los estudios de Bioconcentración descriptos en las secciones anteriores, es posible encontrar similitudes en el comportamiento de los metales, si bien se realizaron en forma individual y con una sola especie. Estos hallazgos coinciden con las experiencias de bioconcentración realizadas por Umebese et al. (2008) donde plantas expuestas a 9 mg Zn/L presentaron un FBC mayor que el obtenido a una concentración menor de 3 mg Zn/L, coincide con los resultados obtenidos en la Figura 47, para las tres especies estudiadas, ya que a los dos días los FBC fueron mayores que a los intervalos siguientes, donde la concentración del Zn en solución fue menor. Considerando las experiencias realizadas con el Cd en forma individual, también coinciden con lo hallado por otros autores, donde frente a bajas concentraciones de Cd, los FBC fueron mayores, en correspondencia con lo observado para las tres especies de macrófitas en la Figura 49 (Bunluesin et al. 2004; Kumar et al. 2003; Parnian et al. 2016).

Los distintos comportamientos de las macrófitas respecto a la incorporación y bioconcentración de los metales puede deberse a la activación en las plantas de una compleja red de estrategias para el almacenamiento y/o detoxificación. Estos pueden incluir

compuestos quelantes en xilema (histidina, ácidos orgánicos) o en citosol como fitoquelatinas y metalotioneínas que mediante transportadores ubicados en las membranas vacuolares y activación de los mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos les permite coexistir en un medio multimetal (Yadav et al. 2018).

Las experiencias descritas constituyen experiencias preliminares acerca del comportamiento de un sistema muliespecífico y multimetal. Sería interesante la exploración y profundización de las estrategias utilizadas por la plantas a fin de comprender con más detalle las diferencias observadas en la incorporación y bioconcentración de los metales en esta situación.

Como se indicó en Materiales y Métodos, se realizaron ensayos de ecotoxicidad con la solución multimetal preparada al inicio del proceso y al final del sistema de fitoremediación implementado. Estos ensayos tuvieron el objetivo de verificar la eficiencia del sistema de fitoremediación mediado por las tres especies de macrófitas. Estos ensayos permitieron conocer la toxicidad global del efluente artificial preparado, de manera de simular una situación lo más cercana a una realidad ambiental.

Los resultados de estas evaluaciones se muestran a continuación.

Tabla 123. % de inmovilidad de *Daphnia magna* en los ensayos de ecotoxicidad realizados con el efluente artificial (EA) al inicio y al final del tratamiento con las macrófitas acuáticas.

% EA	Inicial EA	Final EA
6	0	0
12	0	0
25	25	0
50	30	0
100	100	15

Tabla 124. % de inhibición del crecimiento de *Pseudokirchneriella subcapitata* en los ensayos de ecotoxicidad realizados con el efluente artificial (EA) al inicio y al final del tratamiento con las macrófitas acuáticas.

% EA	Initial EA	Final EA
6	10	0
12	30	0
25	100	0
50	100	0
100	100	19

Se puede observar que diluciones del efluente artificial por encima de 50 % fueron tóxicas para *D. magna*, con una EC50 de 70%, y de 25% con una EC50 de 20% para *P. subcapitata* al inicio de la preparación del efluente, causando el 100% de inmovilización de *D. magna* y 100% de inhibición del crecimiento de la microalga *P. subcapitata* en presencia del efluente al 100% (Tabla 123, Tabla 124).

Al final de 10 días del proceso de fitoremediación, se observó que el 100% del efluente artificial produjo solamente un 15 % de inmovilización de *D. magna* y un 19% de inhibición del crecimiento algal, siendo valores no significativamente diferentes del control (Tablas 123 y 124).

Los ensayos de ecotoxicidad verificaron la ausencia de toxicidad del efluente artificial al final del proceso de fitoremediación implementado, mediado por las plantas, demostrando la capacidad y factibilidad del sistema desarrollado en la remoción de Zn, Ni y Cd presentes en forma simultánea en concentraciones de estos metales entre 1 y 3 mg/L.

Se concluye que la batería de macrófitas utilizadas en el sistema de fitoremediación produjo una eficiente remoción de los metales en solución presentando una capacidad de biacumulación que define a las especies *Lemna gibba*, *Spirodela* sp y *Ceratophyllum demersum* como una herramienta a ser utilizadas en gran escala en tecnologías de bajo costo y en armonía con el medio ambiente, como lo es la Fitoremediación, para la remoción de metales desde aguas residuales o efluentes industriales.

7. CONCLUSIONES

En la presente tesis se evaluaron los efectos de los metales Zinc, Níquel y Cadmio sobre la macrófita flotante *Lemna gibba* y la macrófita sumergida *Ceratophyllum demersum* estudiando la acción sobre el crecimiento, caracteres morfométricos y bioquímicos. Se estudió la acción de los metales en forma individual y en mezclas binarias y trinarias en *L. gibba* y se realizaron además estudios de biacumulación sobre *C. demersum*.

Las evaluaciones realizadas con ambas especies analizando las distintas variables y la integración de la información obtenida, permiten confirmar las hipótesis planteadas y concluir que los metales producen efectos adversos alterando diferentes procesos que determinan una sensibilidad diferencial, permitiendo además la aplicación del conocimiento generado en fitoremediación.

Los metales Zinc, Níquel y Cadmio evaluados en forma individual, afectaron la tasa de crecimiento, parámetros morfométricos, cohesión de la colonia, pigmentos y enzimas del estrés oxidativo de la macrófita flotante *Lemna gibba*. La acción tóxica de cada uno de los metales fue caracterizada mediante el análisis integrado de las variables estudiadas. Para los estudios sobre *Lemna gibba*, el análisis de la tasa de crecimiento estimada en base a distintas variables permitió concluir que el Cd fue el metal que más afectó este parámetro cuando se consideró el peso fresco. El Ni afectó la tasa de crecimiento de forma moderada, pero de igual magnitud considerando tanto el número de frondes como el área de las mismas. El Zn fue el metal más tolerado por la planta, siendo el área total el parámetro donde se observó menor inhibición, mientras que las tasas basadas en número de frondes y peso fresco mostraron mayor inhibición y valores similares entre ellas. En cuanto a los parámetros morfométricos, la sensibilidad del parámetro eje longitudinal total fue mayor para evidenciar los efectos del Ni, seguidos por el Cd y el Zn, en cambio el eje transversal total fue el más sensible para detectar los efectos del Cd.

El Cd y el Zn ejercieron un efecto sobre la cohesión de las colonias, ya que se observó una desagregación de las mismas, en concordancia con el aumento de la concentración de los mismos. Debido a su acción sobre los mecanismos de abscisión, este parámetro podría ser utilizado como un biomarcador igualmente sensible a la actividad de las enzimas antioxidantes. La desagregación de las colonias fue particularmente notoria en los

tratamientos con Cd, pudiéndose concluir que dicho parámetro mostró una gran capacidad de evidenciar la toxicidad de este metal sobre *L. gibba* debido a su gran sensibilidad. Por lo tanto, es un parámetro novedoso que tiene como ventajas una facilidad de determinación y no ser destructivo, por lo cual es altamente recomendable de tener en cuenta en diagnóstico ecotoxicológico. En cuanto a los ensayos individuales, el Ni resultó ser el metal que menos afectó la desagregación de las colonias en el rango de concentraciones evaluadas.

Respecto a la acción sobre la concentración de pigmentos, se observó una disminución del contenido de los mismos para los tres metales, así como una reducción en el contenido proteico. El Ni afectó en mayor medida las concentraciones de los tres pigmentos estudiados, clorofila “a”, clorofila “b” y carotenoides. Comparando los pigmentos entre sí, se observó que en general el contenido de carotenoides fue el pigmento que menos resultó afectado por los tratamientos con los tres metales.

Se pudo evidenciar un incremento de la formación de especies reactivas del oxígeno y por lo tanto de generación de estrés oxidativo bajo las exposiciones a los tres metales en forma individual ya que se observó un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas. Respecto a esta acción de los metales sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, se puede concluir que se observó un incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes, especialmente de APOX y GPOX, siendo esta última la que presentó más actividad.

Los altos niveles de enzimas antioxidantes observados, podrían ser la causa de la tolerancia al estrés inducido por los metales en *L. gibba*. Mientras que las concentraciones subletales de los tres metales no resultaron afectar significativamente los parámetros de crecimiento y morfológicos evaluados, la actividad enzimática sí mostró una actividad diferente a la de los controles, pudiendo ser una alternativa importante y útil como biomarcador temprano de exposición a Ni, Zn y Cd.

Las evaluaciones de mezclas binarias de los metales Ni, Zn y Cd permiten concluir que las diferentes variables de respuesta estudiadas evidenciaron una gran toxicidad por parte las mismas en las diferentes combinaciones evaluadas.

Se observó una notoria desintegración de las colonias, lo cual resultó en una relación frondes/colonias que se vio afectada negativamente en las tres mezclas, la cual fue particularmente disminuida para la mezcla Cd/Zn. Coherentemente con lo observado para

las mezclas individuales, esta mezcla fue la que no contenía Ni, el cual como se ha mencionado previamente fue el metal que individualmente no produjo efecto significativo sobre este índice.

Se pudo demostrar que las interacciones de los metales, en dichas mezclas binarias, difirieron en cuanto a su naturaleza dependiendo de qué pares de metales se esté considerando. Los resultados obtenidos acerca de los metales Zn, Ni y Cd evaluados en mezclas binarias sobre *L. gibba*, a fin de analizar el comportamiento de los mismos en la mezcla, permitieron concluir que la toxicidad en la interacción entre Ni y Zn, estaría correctamente descrita por el modelo de Concentración Aditiva. Para el caso de la mezcla Cd/Zn, se observó una interacción sinérgica para la mayoría de las combinaciones de concentraciones, las cuales contenían una concentración de Zn no mayor a 50 mg/L, mientras que fue observado un antagonismo cuando el Zn estuvo presente en mayores concentraciones. Por su parte, el análisis de la mezcla Cd/Ni permitió concluir que estos metales presentaron una interacción antagónica.

Los ensayos ecotoxicológicos llevados a cabo a fin de evaluar la acción de las mezclas trinarias de los metales Ni, Zn y Cd sobre plantas *L. gibba*, mostraron una toxicidad que fue evidenciada por ambas variables analizadas, inhibición del crecimiento de las raíces e inhibición del número de frondes. En este sentido el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces resultó ser más sensible que el porcentaje de inhibición del número de frondes en las experiencias con ambas concentraciones de COD disuelta.

Se pudo evidenciar una posible competencia entre los metales en las mezclas, en los ensayos con ambas concentraciones de COD, por la incorporación dentro del tejido de la planta evidenciado por una concentración mayor de los metales en los digestados de las plantas expuestas a los metales individualmente. Comparando la incorporación de los metales en las exposiciones individuales para las dos concentraciones de COD evaluadas, se observó una diferencia de incorporación dependiente de la concentración de COD para el Ni.

Se pudieron cuantificar desviaciones respecto al modelo de Concentración Aditiva tanto cuando la concentración de exposición considerada fue el metal disuelto en solución como cuando fue el metal incorporado en tejido vegetal. Para todas las situaciones las interacciones entre los metales en cuestión, en las concentraciones evaluadas, fueron

menores que aditivas. Se puede concluir en este sentido, que no se observaron en general menores desviaciones de la aditividad por considerar la concentración interna en tejido como concentración de exposición bajo ninguna de las dos concentraciones de COD evaluadas.

Los estudios realizados sobre la acción de los metales Zn, Ni y Cd en forma individual sobre distintos parámetros de *Ceratophyllum demersum*, permitieron concluir que el Cd resultó el metal más tóxico para esta especie, produciendo clorosis y disgregación de las hojas. Al igual que *L. gibba*, esta especie mostró más tolerancia al Zn que al resto de los metales, vinculada con una incrementada actividad del sistema antioxidante combinado con un proceso de bioacumulación. Las macrófitas evaluadas presentaron diferencias en su sensibilidad a los distintos metales. Por parte de *C. demersum*, el peso fresco fue el parámetro más sensible de todos los evaluados para describir la acción de los metales. La actividad de las enzimas del estrés oxidativo permitió detectar efectos subletales de los metales sobre esta especie, principalmente las enzimas APOX y GPOX. De esta manera estos biomarcadores permiten la detección temprana de efectos, como lo observado en los estudios realizados con *L. gibba*.

Se puede concluir que los ensayos de toxicidad llevados a cabo con las macrófitas de diferente representatividad ecológica *Lemna gibba* y *Ceratophyllum demersum* con alta presencia en ambientes acuáticos lénticos de la provincia de Buenos Aires, resultan una herramienta de diagnóstico ecotoxicológico de alta sensibilidad para la evaluación de efectos fitotóxicos de contaminantes persistentes como lo son los metales, evaluados en este trabajo.

Los estudios de bioacumulación con la planta *C. demersum*, permitieron concluir que éstas acumularon los tres metales estudiados en forma individual, llegando a un valor constante entre los 9 y 14 días. Se lograron determinar diferentes parámetros de relevancia en cuanto a la cinética de bioacumulación de los metales Ni, Zn y Cd por parte de la planta *C. demersum*, los cuales resultan una herramienta fundamental para lograr un acercamiento a los conocimientos necesarios en la aplicación de esta macrófita en tecnologías de fitoremediación.

En cuanto a las experiencias de fitoerremediación, la batería de tres especies de macrófitas acuáticas utilizadas para la remoción de metales desde el sistema multi-metal

implementado, resultó altamente eficiente, ya que la ecotoxicidad del efluente artificial al final del proceso de fitoremediación se redujo en un 80%, validado mediante ensayos de ecotoxicidad con Cladóceros y microalgas.

Las diferentes variables de respuesta evaluadas en el presente trabajo conforman los elementos de una batería necesaria si se desea comprender de forma integrada los efectos tóxicos sobre los sistemas biológicos utilizados, ya que cada uno aporta información relevante y complementaria. Además, debido a las diferencias en la sensibilidad de estas variables de respuesta, dependiendo del tóxico y la especie, se sugiere que en estudios de fitotoxicidad éstas abarquen un abanico amplio mejorando así la capacidad de detectar toxicidad al considerar un espectro mayor de procesos fisiológicos y posibles sitios de acción de los contaminantes, permitiendo la preservación y conservación de los ecosistemas acuáticos.

El conocimiento de los mecanismos involucrados en la toxicidad y tolerancia a los metales puede ser utilizado en tecnologías de fitoremediación de aguas residuales y efluentes industriales, como ha sido demostrado preliminarmente en este trabajo representando una línea de trabajo iniciada en esta tesis y que corresponderá con objetivos de futuras investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas K.F. (2017). Physiological responses of *Ceratophyllum demersum* L. to Nickel (Ni) and evaluation its phytoremediation potential. J Chem Biol Phys Sci 2:299-306.
- Akhtar T., Lampi M. y Greenberg B. (2005). Identification of six differentially expressed genes in response to copper exposure in the aquatic plant *Lemna gibba* (duckweed). Environ Toxicol Chem 24:1705-1715.
- Álvarez A., Saez J.M., Davila Costa J.S., Colin V.L., Fuentes M.S., Cuozzo S.A., Benimeli C.S., Polti M.A. y Amoroso M.J. (2017). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. Chemosphere 166:41-62.
- Andresen E., Opitz J., Thomas G., Stärkb H.J., Dienemann H., Jenemann K., Dickinson B.C. y Küppera H. (2013). Effects of Cd & Ni toxicity to *Ceratophyllum demersum* under environmentally relevant conditions in soft & hard water including a German lake. Aquat Toxicol 142(143):387-402.
- Apel K. y Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55:373-399.
- APHA-AWWA-WPCF. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. Ed. Clesceri, Greenberg and Trussell 19^o edition, Washington, USA.
- Appenroth K.J., Krech K., Keresztes Á., Fischer W. y Koloczek H. (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. Chemosphere 78(3):216-223.
- Aravind P. y Prasad M.N.V. (2003). Zinc alleviates cadmium induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: A free floating freshwater macrophyte. Plant Physiol Biochem 41:391-397.
- Aravind P. y Prasad M.N.V. (2005). Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L: adaptative ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. Braz J Plant Physiol 17(1):3-20.
- Aravind P., Prasad M.N.V., Malec P., Waloszek A. y Strzałka K. (2009). Zinc protects *Ceratophyllum demersum* L. (free-floating hydrophyte) against reactive oxygen species induced by cadmium. J Trace Elem Med Bio 23:50-60.

- Asada K. (1992). Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85:235-241.
- Backhaus T. y Faust M. (2009). State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final report, The School of Pharmacy, University of London.
- Barceló J. y Poschenrieder C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta* 2:345-361.
- Basile A., Sorbo S., Cardi M., Lentini M., Castiglia D., Cianciullo P., Conte B., Loppi S. y Esposito S. (2015). Effects of heavy metals on ultrastructure and Hsp70 induction in *Lemna minor* L. exposed to water along the Sarno River, Italy. *Ecotoxicol Environ Saf* 114:93-101.
- Beckett P.H.T. y Davis R.D. (1978). The additivity of the toxic effects of Cu, Ni and Zn in young barley. *New Phytol* 81:155-173.
- Belgers J.D.M., Van Lieverloo R.J., Van der Pas L.J.T. y Van den Brink P.J. (2007). Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. *Aquat Bot* 86:260-268.
- Benavides P., Gallego S. y Tomaro L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol* 17:21-34.
- Besson-Bard A., Gravot A., Richaud P., Auroy P., Duc C., Gaymard F., Taconnat L., Renou J.P., Pugin A. y Wendehenne D. (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol* 149:1302-1315.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2):248-254.
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I. y Lux A. (2006). Zinc in plants. *New Phytol* 173:677-702.
- Boscolo P.R.S., Menossi M. y Jorge R.A. (2003). Aluminum induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62:181-189.
- Bhuiyan M.A.H., Suruvi N.I., Dampare S.B., Islam M.A., Quraishi, S.B., Ganyaglo S. y Suzuki S. (2010). Investigation of the possible sources of heavy metal contamination in

- lagoon and canal water in the tannery industrial area in Dhaka, Bangladesh. Environ. Monit Assess. 175(1-4):633-649.
- Bunluesin S., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Lanza G.R., Upatham E.S. y Soonthornsarathool V. (2004). Plant screening and comparison of *Ceratophyllum demersum* and *Hydrilla verticillata* for cadmium accumulation. Bull Environ Contam Toxicol 73:591-598.
 - Calamari D. y Alabaster J.S. (1980). An approach to theoretical model in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. Chemosphere 9:533:538.
 - Camarena-Gutiérrez G. (2006). Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 12:25-30.
 - Caverzan A., Passaia G., Rosa S.B., Ribeiro C.W., Lazzarotto F. y Margis-Pinheiro M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genet Mol Biol 35(4):1011-1019.
 - Cedergreen N., Sørensen H. y Svendsen C. (2012). Can the joint effect of ternary mixtures be predicted from binary mixture toxicity results? Sci Total Environ 427-428:229–237
 - Cempel M. y G. Nikel. (2006). Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. Polish J Environ Stud 15(3):375-382.
 - Chance B., Sies H. y Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 59:527-605.
 - Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M.H y Ferjani E.E. (1997). Cadmium and zinc induction of peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Sci 127:139-147.
 - Chen M., Zhang L.L., Li J., He X.J. y Cai J.C. (2015). Bioaccumulation and tolerance characteristics of a submerged plant (*Ceratophyllum demersum* L.) exposed to toxic metal lead. Ecotoxicol Environ Saf 122:313-321.
 - Cherif J, Mediouni C, Ben Ammar W, Jemal F. (2011). Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). J Environ Sci 23:837-844.

- Chorom M., Parnian A. y Jaafarzadeh N. (2012). Nickel Removal by the Aquatic Plant (*Ceratophyllum Demersum* L.). Int J Environ Sci Development 3(4):372-375.
- Cirelli A. (2006). Uso de macrófitos para la remoción de metales pesados. Revista de Ingeniería Sanitaria y ambiental 86:102-105.
- Cobbett C. 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. Plant Physiol 123:825-832.
- Connell D.W. (1990). Bioaccumulation of xenobiotic compounds. CRC Press, FL 219 pág.
- Davies K.J.A. (2005). The broad spectrum of responses to oxidative stress in proliferating cells. Handb Envir Chem 2(O):63-75.
- Davies J., Dohmen P. y Arts GHP. (2011). A proposed OECD test guideline for the submerged, sediment-rooted macrophyte, *Myriophyllum*. En: Navigating environmental challenges: historical lessons guiding future directions, SETAC, 32nd annual meeting, Boston, USA, 13 - 17 November.
- Demidchik V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. Environ Exp Bot 109:212-228.
- Demim S., Drouiche N., Aouabed A., Benayad T., Dendene-Badache O. y Semsari S. (2013) Cadmium and nickel: Assessment of the physiological effects and heavy metal removal using a response surface approach by *L. gibba*. Ecol Eng 61(1):426-435.
- de Oliveira L.F., Santos C., Risso W.E. y Dos Reis Martinez C.B. (2018). Triple-mixture of Zn, Mn, and Fe increases bioaccumulation and causes oxidative stress in freshwater neotropical fish. Environ Toxicol Chem. 37(6):1749-1756.
- Devi S.R. y Prasad M.N.V. (1998). Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* (coontail), a free-floating macrophyte response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Sci. 138:157-165.
- Díaz A. (2003). La estructura de las catalasas. Revista de educación bioquímica 22(2):76:84.
- Dirilgen N. 2011. Mercury and lead: assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor*. Ecotoxicol Environ Saf 74(1):48-54.
- DiTomaso J.M., Kyser G.B., Oneto S.R., Wilson R.G., Orloff S.B., Anderson L.W., Wright S.D., Roncoroni J.A., Miller T.L., Prather T.S., Ransom C., Beck K.G., Duncan

- C., Wilson K.A. y Mann J.J. (2013). Weed control in natural areas in the Western United States. Weed Research and Information Center, University of California, 544 pp.
- Dogan M., Karatas M. y Aasim M. (2018). Cadmium and lead bioaccumulation potentials of an aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L.: a laboratory study. *Ecotoxicol Environ Safety* 148:431-440.
 - Doğanlar Z.B. (2013). Metal accumulation and physiological responses induced by copper and cadmium in *Lemna gibba*, *L. minor* and *Spirodela polyrhiza*. *Chem Speciat Bioavailab* 25(2):79-88.
 - Doncheva S., Stoyanova Z., y Velikova V. (2001). Influence of succinate on zinc toxicity of pea plants. *J plant nutr* 24(6):789-804.
 - Drost W., Matzke M. y Backhaus T. (2007). Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere* 67(1):36-43.
 - Environmental Technology Centre (ETC), Environment Canada. (2007). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. 2007. EPS 1/RM/37. Environment Canada.
 - Fawzy M.A., Badr N.E.S., El-Khatib A. y Abo-El-Kassem A. (2012). Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile. *Environ. Monit Assess* 184:1753-1771.
 - Feiler U., Kirchesch I. y Heininger P. (2004). A New Plant-based Bioassay for Aquatic Sediments. *J Soil Sed* 4(4):261-266.
 - Feiler U. y Arts G. (2012). Sediment contact test with *Myriophyllum aquaticum* (ISO/DIS 16191): first results of an international ring test. In: Securing a sustainable future: integrating science, policy and people, SETAC, 6th world congress / SETAC Europe 22nd annual meeting, Berlin, 20 - 24 May.
 - Fernández D.S., Puchulu M.E. y Georgieff S.M. (2014). Identification and assessment of water pollution as a consequence of a leachate plume migration from a municipal landfill site (Tucuman, Argentina). *Environ Geochem Health* 36:489-503.
 - Foyer C.H. y Noctor G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17:1866-1875.

- Gallego S.M., Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Iannone M.F., Rosales E.P., Zawoznik M.S., Groppa M.D. y Benavides M.P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ Experim Bot* 83:33-46.
- Gautam S., Rathoure A.K., Chhabra A. y Pandey S.N. (2017). Effects of nickel and zinc on biochemical parameters in plants- a review. *Oct J Env Res* 5(1):014-021.
- Gechev T., Gadjev I., Dukiandjiev S. y Minkov I. (2005). Reactive oxygen species as signaling molecules controlling stress adaptation in plants. En: handbook of photosynthesis (2nd ed). Taylor & Francis Group, LLC.
- Gill S.S. y Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909-930.
- Gopalapillai Y., Vigneault B. y Hale B.A. (2012). Effect of pH and environmental ligands on accumulation and toxicity of Ni²⁺ to *Lemna minor*. *Environ Chem* 9:547-557.
- Gopalapillai Y. y Hale B.A. (2015). Evaluating the concentration addition approach for describing expected toxicity of a ternary metal mixture (Ni, Cu, Cd) using metal speciation and response surface regression. *Environ Chem* 13(3):447-456.
- Gopalapillai Y. y Hale B.A. (2017). Internal versus External Dose for Describing Ternary Metal Mixture (Ni, Cu, Cd) Chronic Toxicity to *Lemna minor*. *Environ Sci Technol* 51(9):5233-5241.
- Gomes-Junior R.A., Moldes C.A., Delite F.S., Gratao P.L., Mazzafera P., Lea P.J. y Azevedo R.A. (2006). Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiol Biochem* 44(5-6):420-429.
- Gomes-Junior R.A., Moldes C.A., Delite F.S., Pompeu G.B., Gratao P.L., Mazzafera P., Lea P.J. y Azevedo R.A. (2006a). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65:1330-1337.
- Griffiths H.R. (2005). Chemical Modifications of Biomolecules by Oxidants. *Handb Environ Chem* 2(O):33-62.
- Groppa, M.D., Rosales, E.P., Iannone, M.F., Benavides, M.P., (2008). Nitric oxide polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* 69:2609-2615.
- Guilizzoni P. (1990). The role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of submersed macrophytes. *Aquat Bot* 41:87-109.

- Hadad H.R., Maine A. y Bonetto C. (2006). Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere* 63:1744-1753.
- Halaimi F.Z., Kellali Y., Couderchet M. y Semsari S. (2014). Comparison of biosorption and phytoremediation of cadmium and methyl parathion, a case-study with live *Lemna gibba* and *Lemna gibba* powder. *Ecotoxicol Environ Saf* 105(1):112-120.
- Harguinteguy C.A., Fernández Cirelli A. y Pignata M.L. (2014). Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckenia filiformis* and its relationship with sediment and water in the Suquía river (Argentina). *Microchem J* 114:111-118.
- Harguinteguy C.A., Pignata M.L., Fernández-Cirelli A. (2015). Nickel, lead and zinc accumulation and performance in relation to their use in phytoremediation of macrophytes *Myriophyllum aquaticum* and *Egeria densa*. *Ecol Eng* 82:512-516.
- Hegedus A., Erdei S. y Horváth G. (2001). Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci* 160:1085-1093.
- Hou W., Chen X., Song G., Wang Q. y Chang C.C. (2007). Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol Biochem* 45:62-69.
- Huang C.L., Bao L.J., Luo P., Wangad Z.Y., Li S.M. y Zeng E.Y. (2016). Potential health risk for residents around a typical e-waste recycling zone via inhalation of size-fractionated particle-bound heavy metals. *J Hazard Mater* 317:449-456.
- Hyldgaard B., Sorrell B., Olesen B., Riis T. y Brix H. (2012). Geographically distinct *Ceratophyllum demersum* populations differ in growth, photosynthetic responses and phenotypic plasticity to nitrogen availability. *Functional Plant Biol* 39:774-783.
- Hyldgaard B., Sorrell B. y Brix H. (2014). Closely related freshwater macrophyte species, *Ceratophyllum demersum* and *C. submersum*, differ in temperature response. *Freshwater Biol* 59:777-788.
- Jain M., Garg V.K., Kadirvelu K., Sillanpa M. (2016) Adsorption of heavy metals from multi-metal aqueous solution by sunflower plant biomass-based carbons. *Int J Environ Sci Technol* 13:493-500.

- Jung S., Kim J.S., Cho K.Y., Tae G.S. y Kang B.G. (2000). Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photo inhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. *Plant Sci* 153:145-154.
- Kaoud H.A., Zaki M.M., El-Dahshan A.R., Saeid S. y El Zorba H.Y. (2011). Amelioration the toxic effects of cadmium-exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by using *Lemna gibba* L. *Life Sci J* 8(1):185-195.
- Khellaf N. y Zerdaoui M. (2009). Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. *Bioresour Technol* 100(23):6137-6140.
- Khellaf N. y Zerdaoui M. (2010). Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation. *Ecotoxicology* 19(8):1363-1368.
- Kumar R., Mishra R.K., Mishra V., Qidwai A., Pandey A., Shukla S.K., Pandey M., Pathak A. y Dikshit A. (2016). Detoxification and tolerance of heavy metals in plants. En: *Plant Metal Interaction* (A. Pandey, Ed.). Elsevier, Amsterdam, pp 335-359.
- Lahive E., O' Halloran J. y Jansen M.A.K. (2011). Differential sensitivity of four Lemnaceae species to zinc sulphate. *Environ Exp Bot* 71:25-33.
- Landolt E. y Zarzycki K. (1994) Ecological field investigations of duckweed (*Lemnaceae*) in Argentina. *Ber. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel Zürich* 60:62-109, f. 1-12.
- Landolt E. y Kandeler R. (1987) The family of *Lemnaceae*-a monographic study. vol. 2, *Veröff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel Zürich* 95:1-638.
- Landolt E. (1986) The family of *Lemnaceae*-a monographic study. vol. 1, *Veröff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel Zürich* 71:1-566.
- Li J.L., Zhang C.X., Wang Y.X., Liao X.P., Yao L.L., Liu M. y Xu L. (2015). Pollution characteristics and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in groundwater at Xiaodian Sewage Irrigation Area, Taiyuan City. *Huanjing Kexue/Environ Sci* 36:172-178.
- Li Y. y Xiong Z.T. (2004). Cadmium induces colony disintegration of duckweed (*Lemna paucicostata*) and biomarker of phytotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 59:174-179.
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Meth Enzymol* 148:350-382.

- Lin Q. y Mendelssohn I.A. (2008). Determining tolerance limits for restoration and phytoremediation with *Spartina patens* in crude oil-contaminated sediment in greenhouse. *Arch Agron Soil Sci* 54(6):681-690.
- Liu M.Q., Yanai J., Jiang R.F., Zhang F., McGrath S.P. y Zhao F.J. (2008). Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? *Chemosphere* 71:1276-1283.
- Lovett Doust J., Schmidt M. y Lovett Doust L. (1994). Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biol Rev* 69:147-186.
- Maehly A.C. y Chance B. (1954). The assay of catalase and peroxidase. En: Glick D., ed., *Methods of biochemical analysis* Vol. 1, pp 357
- Maltby L., Arnold D., Arts G., Davies J., Heimbach F., Pickl C., Poulsen V. (2010). Aquatic macrophyte risk assessment for pesticides. SETAC Europe Workshop AMRAP, Wageningen, Netherlands, pp 135. SETAC Press & CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York.
- Maine M.A., Suñe N., Hadad H., Sánchez G. y Bonetto C. (2009). Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *J Environ Ma* 90:355-363.
- Manios T., Stentifor E.I. y Millner P.A. (2003). The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. *Ecol Eng* 20:65-74.
- Margalef R. (1983). *Limnología*. Omega, Barcelona. 1010 pp.
- Martinka M., Vaculik M. y Lux A. (2014). Plant cell responses to cadmium and zinc. En Nick P., Opatrny Z., eds, *Applied plant cell biology cellular tools and approaches for plant biotechnology*. Springer, Berlin, Germany, pp 209-246.
- Megateli S., Semsari S. y Couderchet M. (2009). Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72(6):1774-1780.
- Mizuno M., Kamei M. y Tsuchida H. (1998). Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochem Mol Biol Int* 44(4):717-726.

- Moller I., Jensen P., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:459-81.
- Montvydienė D. y Marčiulionienė D. (2007). Assessment of toxic interaction of metals in binary mixtures using *Lepidium sativum* and *Spirodela polyrrhiza*. *Polish J Environ Stud* 16(5):777-783.
- Mowat F.S. y Bundy K.J. (2002). Experimental and mathematical/computational assessment of the acute toxicity of chemical mixtures from the Microtox® assay. *Adv Environ Res* 6:547-558.
- Mullineaux M.P., Karpinski S. y Creissen G.P. (2008) Integration of Signaling in Antioxidant Defenses. En: Demmig-Adams B. et al. (eds), *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*, © Springer Science+Business Media B.V. pp 223-239.
- Nakano Y. y Asada K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol* 22:867-880.
- Nazar R., Iqbal N., Masood A., Khan M.I.R., Syeed S. y Khan N.A. (2012). Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *Am J Plant Sci* 3:1476-1489.
- Nordberg G., Fowler B.A., Nordberg M. y Friberg L.T. (2007). Introduction-General Considerations and International Perspectives. En: *Handbook on the toxicology on metals*. (G. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg y L.T. Friberg, Ed.) Academic Press, Cambridge, UEA, pp. 1-9.
- OECD. (2006). Guidelines for the testing of chemicals. Revised proposal for a new guideline 221 *Lemna* sp. growth inhibition test. 22 pp.
- OECD. (2014). Guidelines for the testing of chemicals. Water-sediment *Myriophyllum spicatum* toxicity test (TG 239). ENV/JM/WRPR 16. 20 pp.
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., del Río L.A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem* 40:521-530.
- Pan H., Li X., Xu X. y Gao S. (2009). Phytotoxicity of four herbicides on *Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria spiralis* and *Elodea nuttallii*. *J Environ Sci* 21:307-312.

- Papoyan A., Piñeros M. y Kochian L.V. (2007). Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 175:51-58.
- Paquin P., Gorsuch J., Apte S., Batley G., Bowles K, Campbell P., Delos C., Di Toro D., Dwyer R., Galvez F., Gensemeri R., Goss G., Hogstrand C., Janssen C., McGeer J., Naddy R., Playlen R., Santore R., Schneider U., Stubblefield W., Wood C. y Wu K. (2002). The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochem Physiol Part C* 133:3-35.
- Parlak K.U. y Yilmaz D.D. (2013) Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium. *Ecotoxicol Environ Saf* 91:79-85.
- Parlak K.U. y Yilmaz D.D. (2012) Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species. *Ecotoxicol Environ Saf* 85:52-58.
- Parnian A., Chorom M., Jaafarzadeh N. y Dinarvand M. (2016). Use of two aquatic macrophytes for the removal of heavy metals from synthetic medium. *Ecohydrol Hydrobiol* 16:194-200.
- Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Méndez A.A.E. y Gallego S.M. (2012). Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings. *Plant Science* 196:1-7.
- Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A. y Forestier C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 32:539-548.
- Polti M.A., Amoroso M.J. y Abate C.M. (2011). Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* sp. MC1. *Water Air Soil Pollut* 214:49-57.
- Prasad M.N.V., Malec P., Waloszek A., Bojko M. y Strzałka K. (2001). Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Science* 161:881-889.
- Rezania S., Taib S., Din M., Dahalan F. y Kamyab H. (2016). Comprehensive review on phytotechnology: heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *J Hazard Mater* 318:587-599.
- Rivera Cabrera F., Buentello Volante B., Díaz de León Sánchez F. y Pérez-Flores L.J. (2008). Especies reactivas de oxígeno en las plantas. En: Radicales libres y estrés

- oxidativo en la salud y en la enfermedad. (M. Konigsberg-Fainstein, Ed.). Sección VIII. El Manual Moderno S.A. de C.V., Ciudad de Mexico, pp. 501-524.
- Rosenwasser S., Rot I., Sollner E., Meyer A.J., Smith Y., Leviatan N., Fluhr R. y Friedman H. (2011). Organelles Contribute Differentially to Reactive Oxygen Species-Related Events during Extended Darkness. *Plant Physiol* 156(1):185-201.
 - Sáenz M.E., Tortorelli M.C., Alberdi J.L. y Di Marzio W.D. (1998). Evaluación de la toxicidad de efluentes industriales mediante la utilización de ensayos ecotoxicológicos: industrias químicas. *Rev Ing Sanitaria y Ambiental AIDIS* 40:49-53.
 - Sáenz M.E., Tortorelli M.C. y Freyre L.R. (2003). Evaluación de la ecotoxicidad de efluentes industriales. *Limnetica* 22(3-4):137-146.
 - Sandstead H.H. y William A.U. (2007) Chapter 47 En: Nordberg et al. (ed), *Handbook on the toxicology on metals* (3ra edn). Academic Press, Burlington, pp 925-947.
 - Seregin I. V. y Kozhevnikova A.D. (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol* 53(2):257-277.
 - Shahid M., Pourrut B., Dumat C., Nadeem M., Aslam M. y Pinelli E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 232:1-44.
 - Sharma S.S., Schat H., Vooijs R. y Van Heerwaarden L.M. (1999). Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures Concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. *Environ Toxicol Chem* 18:348-355.
 - Sharma S.S. y Dietz K.J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14:43-50.
 - Singh A., Malodia P., Kachhawaha M., Ansari N., Jain S.K. y Khatri, P.K. (2011). Effect of EDTA, phosphate, pH and metal species on cadmium and nickel uptake by aquatic macrophyte *Spirodela Polyrrhiza*. *Asian J Water Environ Pollut* 8:51-60.
 - Singhal V. y Rai N. (2003). Biogas production from water hyacinth and channel grass used for phytoremediation of industrial effluents. *Bioresource Technol* 86:221-225.
 - Sobrero M.C., Beltrano J. y Ronco A.E. (2004). Comparative Response of Lemnaceae Clones to Copper(II), Chromium(VI), and Cadmium(II) Toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:416-423.

- Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M. y Vitti A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *Int J Mol Sci* 16:13561-13578.
- Souza V.L., de Almeida A.A.F, Lima S.G.C., Cascardo J.C.M., Silva D.C., Mangabeira P.A.O. y Gomes F.P. (2011). Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Biometals* 24:59-71.
- Sparks T. (2000). *Statistics in Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Subba P., Mukhopadhyay M., Mahato S.K., Bhutia K.D., Mondal T.K. y Ghosh S.K. (2014). Zinc stress induces physiological, ultra-structural and biochemical changes in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) seedlings. *Physiol Mol Biol Plants* 20(4):461-473.
- Susarla S., Medina V. y McCutcheon B. (2002). Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol Eng* 18:647-658.
- Suter G.W. (1993). *Ecological risk assessment*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan 538 pp.
- Thomaz S.M. y Cunha E.R. (2010). The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages' composition and biodiversity. *Acta Limnologica Brasiliensia* 22(2):218-236.
- Tipping E. (1998). Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquat Geochem* 4:3-48.
- Tkalec M., Stefanic P.P., Cvjetko P., Sikic S., Pavlica M. y Balen B. (2014). The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *Plos one* 9(1):1-13.
- Tsuji N., Hirayanagi N., Iwabe O., Namba T., Tagawa M., Miyamoto S., Miyasaka H., Takagi M., Hirata K., Miyamoto K. (2003). Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 62:453-459.
- Tur N.M. (2008). Lemnaceae. En J. A. Hurrell (Dir.) *Fl. Rioplatense. Parte 3 Monocotiledóneas*. Vol. 1: 211-234. Ed. L.O.L.A. Bs. As.

- Umebese C.E. y Motajo A.F. (2008). Accumulation, tolerance and impact of aluminium, copper and zinc on growth and nitrate reductase activity of *Ceratophyllum demersum* (Hornwort). J Environ Biol 29(2)197-200.
- US EPA. (1985). Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. US Environmental Protection Agency, Washington, DC 98 pp. PB85-227049.
- US EPA. (1996). Ecological effects test Guidelines OPPTS 850.440 Aquatic plant toxicity test using Lemna sp. EPA 712-C-96-156, Washington DC.
- US EPA. (1996a). Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Method 3052. 20 pp.
- US EPA. (1996b). Algal Toxicity, Tiers I and II. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.5400. EPA 712-C-96-164.
- US EPA. (1996c). Ecological Effects Guidelines, Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Fresh water Daphnids, OPPTS 850.1010. EPA 7101: 1-10.
- US EPA. (1996d). Ecological Effects Test Guidelines: Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine. EPA 712-C-96-118, OPPTS 850.1075.
- US EPA. (2002). Development of a Framework for Metals Assessment and Guidance for Characterizing and Ranking Metals. Metal Action Plan Group. EPA/630/P-02/003A.
- US EPA. (2002a). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine. Organisms. Fifth Edition. EPA-821-R-02-012.
- US EPA. (2002b). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Fourth Edition, Washington, DC 20460, EPA-821-R-02-013.
- US EPA. (2003). The bioavailability and bioaccumulation of metals. Risk Assessment Forum. Washington, DC
- US EPA. (2004a). The ecological effects of metals. Risk Assessment Forum. Washington, DC.
- US EPA. (2004b). The environmental chemistry of metals. Risk Assessment Forum. Washington, DC
- US EPA. (2007). Framework for Metals Risk Assessment. Office of the Science Advisor Risk Assessment Forum. EPA 120/R-07/001.

- Valdés B., talavera S. y Fernández-Galiano E. (1987). FloraVascular de Andalucía Occidental. Vol 1 Editorial Ketres S.A. pp 489.
- Van Breusegem F., Vranova E., Dat J. y Inze D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 161:405-414.
- Vatta G., Rota R., Boniardi N. y Nano G. (1995). Dynamic modelling of waste-water treatment plants based on *Lemna gibba*. *Chem Eng J* 57:B37-B48.
- Verma R. y Suthar S. (2015). Lead and cadmium removal from water using duckweed – *Lemna gibba* L.: Impact of pH and initial metal load. *Alex Eng J* 54(4):1297-1304.
- Versieren L., Evers S., De Schamphelaere K., Blust R. y Smolders E. (2016). Mixture toxicity and interactions of copper, nickel, cadmium, and zinc to barley at low effect levels: something from nothing? *Environ Toxicol Chem* 35(10):2483-2492.
- Versieren L., Evers S., Abdelgawad H., Asard H. y Smolders E. (2017). Mixture toxicity of copper, cadmium, and zinc to barley seedlings is not explained by antioxidant and oxidative stress biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(1):220-230.
- Wang C., Zhang S.H., Wang P.F., Hou J., Qian J., Zhang W.J. y Lu J. (2009). Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere* 76(7):938-945.
- Wang W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Poll* 59(3-4):381-400.
- Wu Q., Leung J.Y.S., Geng X., Chen S., Huang X., Li H., Huang Z., Zhu L., Chen J. y Lu Y. (2015). Heavy metal contamination of soil and water in the vicinity of an abandoned e waste recycling site: implications for dissemination of heavy metals. *Sci Total Environ* 506:217-225.
- Wuana R.A. y Okieimen F.E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* Article ID 402647.
- Xing W., Shi Q., Liu H. y Liu G. (2016). Growth rate, protein:RNA ratio and stoichiometric homeostasis of submerged macrophytes under eutrophication stress. *Knowledge Man Aquat Ecos* 417(25):1-11.
- Yadav N. y Sharma S. (2006). Reactive Oxygen Species, Oxidative stress and ROS scavenging system in plants. *J Chem Pharm Res* 8:595-604.

- Yadav S.K. (2009). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J Bot* 76(2):167-179.
- Yadav K., Gupta N., Kumar A., Reece L., Singh N., Rezania S. y Khan S. (2018). Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. *Ecol Eng* 120:274-298.
- Yilmaz D.D. y Parlak K.U. (2011). Nickel-induced changes in lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and metal accumulation in *Lemna Gibba*. *Int J Phytoremediation* 13(8):805-817.
- Zar J.H. (2010). *Biostatistical Analysis*. Pearson, Boston, MA, USA.
- Zazo J., Paull J. y Jaffe P. (2008). Influence of plants on the reduction of hexavalent chromium in wetland sediments. *Environ Pollut* 156:29-35.