

Tolerancia al cromo en tres especies de macrófitas flotantes libres (*Lemna sp.*, *Salvinia sp.* y *Azolla sp.*)

*Bárbara Gomez*¹, *Valeria Rodríguez Salemi*¹, *Yanina El Kassisse*¹, *Carlos Gomez*¹ y *Laura de Cabo*²

¹ Instituto Nacional del Agua - Centro de Tecnología del Uso del Agua, ² Museo Argentino de Ciencias Naturales "B. Rivadavia"

bgomez@ina.gob.ar

RESUMEN: La contaminación de los sistemas acuáticos con metales pesados se puede producir como consecuencia del vertido de efluentes industriales con tratamientos inadecuados o sin tratamiento. Los metales no se degradan en el ambiente y pueden ser altamente tóxicos para la biota, bioacumularse en los tejidos de los organismos y depositarse en los sedimentos. A través de diferentes mecanismos de fitorremediación con plantas acuáticas es posible remover y acumular metales de aguas residuales y restaurar ambientes contaminados. El objetivo de este estudio es evaluar la tolerancia de tres plantas flotantes (*Lemna sp.*, *Salvinia sp.* y *Azolla sp.*) a la exposición de cromo proveniente de un proceso de tratamiento de una galvanoplastia. Las plantas fueron expuestas individualmente y por triplicado (ensayo tipo batch) en reactores de plástico con un litro de medio de cultivo (Peterson y Moody, 1997) a diferentes concentraciones de cromo (1, 5, 10 y 20 mg/L). La exposición se llevó a cabo durante 6 días en condiciones de invernadero con fotoperíodo natural a una temperatura entre 20 y 24 °C. Paralelamente se realizaron controles, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones pero sin el agregado de cromo. Al finalizar el ensayo, las plantas fueron recolectadas, lavadas y secadas en estufa a 70 °C. Se determinó la cantidad de cromo total bioacumulado en el tejido y la cantidad de cromo total remanente en el agua. En términos generales no se observaron signos de toxicidad y las tres especies estudiadas mostraron ser tolerantes a la máxima concentración ensayada (20 mg Cr total/L). Se continuarán los estudios con el objetivo de seleccionar la especie más eficiente en la remoción de cromo para su posterior aplicación en procesos de fitorremediación.

INTRODUCCION

La contaminación de los sistemas acuáticos por el vertido de aguas residuales domésticas e industriales no tratadas o con tratamientos ineficientes es uno de los principales problemas a nivel mundial ya que afectan los ecosistemas y en muchos casos ponen en riesgo la salud humana.

A diferencia de la mayoría de los compuestos orgánicos los metales no se degradan en el ambiente y pueden ser altamente tóxicos para la biota, bioacumularse en los tejidos de los organismos y depositarse en los sedimentos.

El cromo y en particular Cr (VI) es un reconocido contaminante ambiental, ya que es un oxidante fuerte y mucho más tóxico que el Cr (III). Está presente con frecuencia en muchos vertidos industriales, especialmente de las curtiembres y actividades de galvanoplastia. Es altamente soluble en los sistemas acuosos y permeable a través de las membranas biológicas produciendo efectos cancerígenos y mutagénicos en organismos vivos.

En este contexto, la fitorremediación acuática es un tipo de tratamiento a través del cual los compuestos presentes en el agua son adsorbidos y/o incorporados dentro de la estructura de las plantas eliminando la contaminación y favoreciendo la restauración de la calidad del agua (Olguín 1994). Esta tecnología ha demostrado ser una opción viable para purificar el agua contaminada con trazas de elementos, debido a su buena relación costo-beneficio y al impacto positivo que tiene sobre el ambiente (Raskyn *et al.*, 1997).

El presente trabajo se realiza en el marco de un proyecto de investigación conjunta entre el Instituto Nacional del Agua y el Museo Argentino de Ciencias Naturales "B. Rivadavia" (MACN) cuyo propósito es estudiar a través de procesos de fitorremediación la remoción de metales pesados en sistemas acuáticos y efluentes.

Los objetivos del presente estudio son:

- evaluar la tolerancia de tres plantas flotantes (*Lemna sp.*, *Salvinia sp.* y *Azolla sp.*) a la exposición de cromo proveniente de un proceso de tratamiento de una galvanoplastia.
- seleccionar la especie más eficiente en la remoción de cromo para su posterior aplicación en procesos de fitorremediación por exposición al cromo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de tolerancia

En este trabajo se utilizaron tres especies de macrófitas flotantes libres: *Lemna sp.*, *Salvinia sp.* y *Azolla sp.* Las plantas provinieron de cultivos mantenidos al aire libre en el MACN y fueron aclimatadas a las condiciones del invernadero durante siete días previos al inicio del ensayo.

El rango de concentraciones de cromo seleccionado fue amplio (1 a 20 mg/L) ya que en esta primera etapa se pretendía conocer la tolerancia de las plantas al metal y además representar las condiciones recomendadas de trabajo para una industria de galvanoplastia. El último enjuague en la galvanización de piezas debe contener entre 5 y 20 mg Cr⁶⁺/L, ya que por debajo de 5 mg/L se gasta agua en exceso y por encima del mismo, se puede perjudicar la calidad del proceso y/o la salud de

los operarios (Colombo y Pennella, 2003). La fuente de Cr utilizada para el ensayo provino del líquido contenido en la batea del 1^{er} enjuague de un baño de cromado perteneciente a un proceso de galvanoplastia de una industria de la provincia de Buenos Aires. La composición de dicho enjuague fue de 21g Cr⁶⁺/L (única especie de Cr presente) y H₂SO₄ al 1%.

El ensayo se llevó a cabo a fines de abril de 2014 en condiciones de invernadero con fotoperíodo natural y temperatura entre los 20 y 24 °C. Consistió en la exposición de tres especies de plantas nativas flotantes (*Lemna sp.*, *Salvinia sp.* y *Azolla sp.*) durante seis días a cuatro concentraciones de cromo total: 1, 5, 10, y 20 mg/L por triplicado (n=3). Los recipientes utilizados fueron bateas de plástico de 40 cm x 25 cm x 20 cm, previamente lavadas con ácido nítrico al 10% y enjuagadas con abundante agua destilada. El volumen total en cada unidad experimental fue de un litro y las diluciones se realizaron con medio de cultivo (Tabla 1) para garantizar la presencia de nutrientes en cada uno de los tratamientos del ensayo. De manera de asegurar que la cantidad de biomasa fuese la misma en todos los tratamientos, se logró una cobertura del 50% en cada unidad experimental.

Tabla 1. Medio de cultivo APHA modificado (Peterson y Moody, 1997) utilizado en los ensayos y en la aclimatación de las plantas.

Sustancia	Concentración Sc Stock (g/L)	Solución Stock*
NaNO ₃	25,5	A
KCl	1,01	
NaHCO ₃	15,0	
K ₂ HPO ₄	1,04	
H ₃ BO ₃	0,186	B
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0073	
ZnCl ₂	0,0033	
CuCl ₂	9,0 x 10 ⁻⁶	
CoCl ₂	0,0008	
MgSO ₄ .7H ₂ O	14,7	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,4149	C
MgCl ₂ .6H ₂ O	12,17	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,16	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,41	

* se tomaron 10 ml de cada solución stock por litro de agua destilada.

Simultáneamente, se llevaron a cabo controles para cada especie en las mismas condiciones de los tratamientos sin el agregado de cromo.

La pérdida de agua por procesos de transpiración y evaporación fue compensada con agua destilada, a fin de evitar el efecto de concentración del contaminante durante el ensayo. Al finalizar el mismo, se registraron los volúmenes de agua de cada unidad experimental. Las plantas fueron cosechadas, lavadas con agua destilada y secadas en estufa a 70 °C. Se determinó el peso seco de la totalidad de las plantas contenidas en cada una de las bateas.

Determinaciones analíticas

En cada unidad experimental se midieron a tiempo cero y al finalizar el ensayo (seis días): pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE), oxígeno disuelto (OD) con sensores marca Hanna®, y contenido de cromo total (Cr T) en tejido vegetal y agua.

El análisis de Cr T en agua y en tejido se realizó mediante digestión por microondas según metodología 3015 y 3052 US EPA (*U.S. Environmental Protection Agency*), respectivamente. Para la determinación de Cr T bioacumulado, se utilizó la planta total molida sin diferenciar partes aéreas y sumergidas. Ambos digestos se midieron por espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS) según metodología propia del equipo Hitachi Z5000. Limite de detección: 0,012 mg/L y Limite de Cuantificación: 0,050 mg/L

Factor de Bioconcentración

El factor de bioconcentración (FBC) fue calculado como la relación entre la concentración del metal en el tejido de la planta y la concentración de este elemento en el ambiente externo (Zayed *et al.* 1998)

$$FBC = P/E \quad (1)$$

Donde: “P” representa la concentración del elemento traza en el tejido de las plantas (mg/Kg peso seco) y “E” representa la concentración del elemento traza en la solución nutritiva externa (mg/L).

El FBC es adimensional. Comparativamente valores mayores de FBC significan una mejor capacidad de bioacumulación.

Análisis estadístico

Los resultados fueron representados por los valores medios de las determinaciones y sus desvíos estándares (n=3). Las diferencias del FBC entre los tratamientos dentro de la misma especie fueron examinadas por análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se realizaron contrastes por test de Tukey ($\alpha=0,05$). Como los datos no cumplían los supuestos de homocedacia y normalidad, estos fueron transformados con raíz cuadrada. Además se realizaron regresiones entre las variables Cr T acumulado en tejido y la concentración de Cr T en solución para establecer relaciones con un nivel de significancia de 0,05. En este caso, *Lemna.sp* y *Azolla.sp* no cumplieron con los supuestos de homocedacia por lo tanto, los datos fueron transformados con logaritmo natural.

RESULTADOS

La Tabla 2 muestra los valores obtenidos de pH, CE, OD y temperatura al inicio y al final del ensayo. Estos parámetros se mantuvieron relativamente constantes aún luego del agregado de la solución con Cr y a lo largo de los seis días para todos los tratamientos.

Tabla 2. Parámetros medidos en cada unidad experimental. Se informa el promedio con su respectivo desvío estándar (n=3).

Variable (unidad)	Inicial	Final
pH	7,1 ± 0,2	7,0 ± 0,2
CE ($\mu\text{S/cm}$)	612,8 ± 16,6	573,4 ± 71,6
OD (mg/L)	8,7 ± 0,7	10,1 ± 1,2
Temperatura (°C)	18,4 ± 0,1	22,3 ± 0,4

Las plantas provenientes de los cultivos (condiciones iniciales) y las de los controles no presentaron cromo en el tejido. En tanto que las plantas que crecieron a diferentes dosis del metal respondieron de manera similar para las tres especies. Esto puede observarse en la figura 1 donde se muestra un aumento en la concentración de Cr T en el tejido a mayor concentración del mismo en el agua. Así mismo, no se observaron diferencias entre las especies para cada concentración de metal en agua salvo en el caso de los 20 mg/L en donde *Lemna sp.* mostró una acumulación menor de este metal respecto a las otras dos especies.

La figura 2 muestra la regresión lineal, para cada una de las especies, entre el Cr T bioacumulado en el tejido y la concentración de Cr T en solución. Se obtuvieron regresiones significativas para *Lemna sp.*, *Azolla sp.* y *Salvinia sp.* ($p < 0,0001$; r^2 0,779, $p < 0,0001$; r^2 0,850 y $p < 0,001$; r^2 0,964, respectivamente). Esto indicaría que, en el rango ensayado, el metal acumulado en las plantas aumenta de forma proporcional a la concentración presente en el agua.

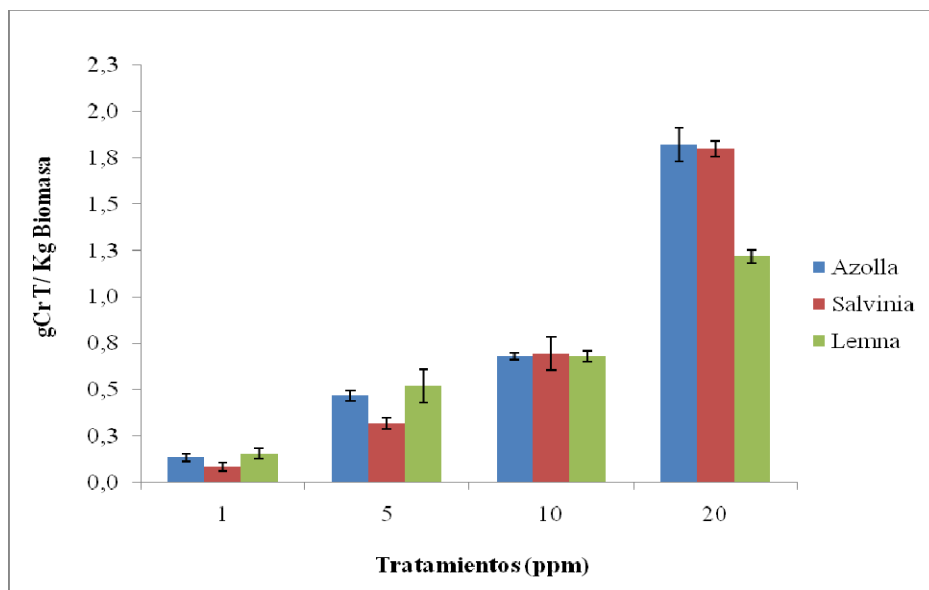


Figura 1. Acumulación de cromo total en el tejido expresado como g CrT/Kg de biomasa seca para las tres especies estudiadas en cada uno de los tratamientos. Las barras de error corresponden al desvío estándar ($n = 3$).

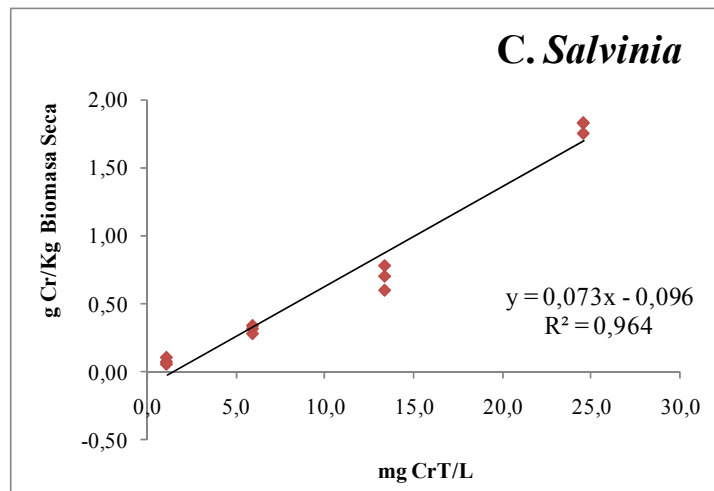
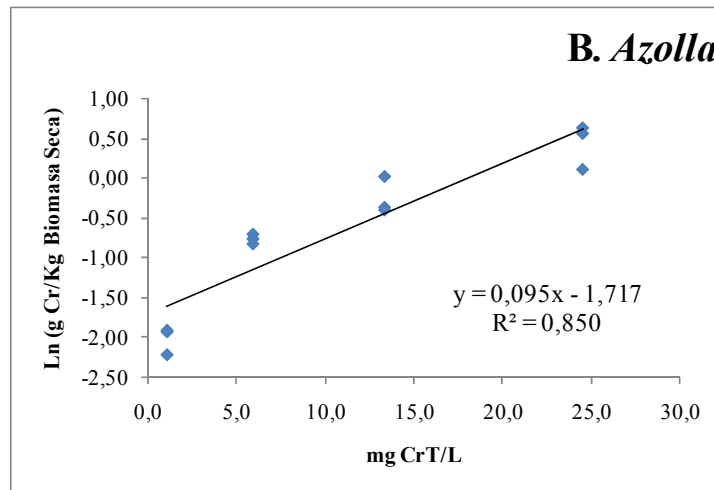
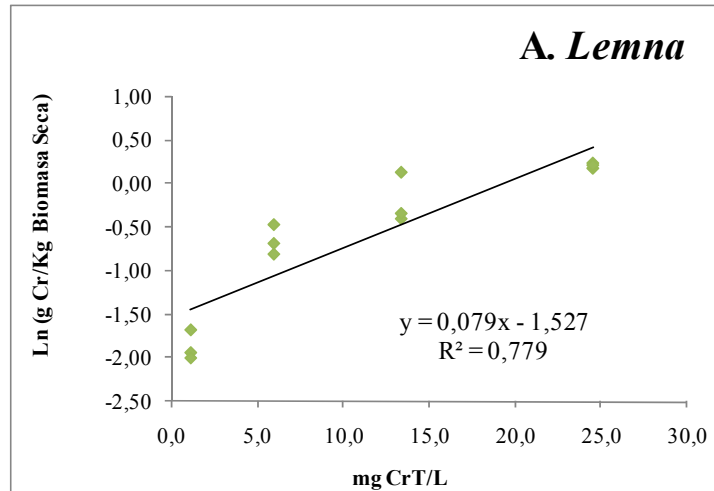


Figura 2. Análisis de regresión lineal entre la concentración de cromo en el tejido vegetal de cada especie en función de la concentración del metal en solución: A) *Lemna* sp. B) *Azolla* sp. C) *Salvinia* sp.

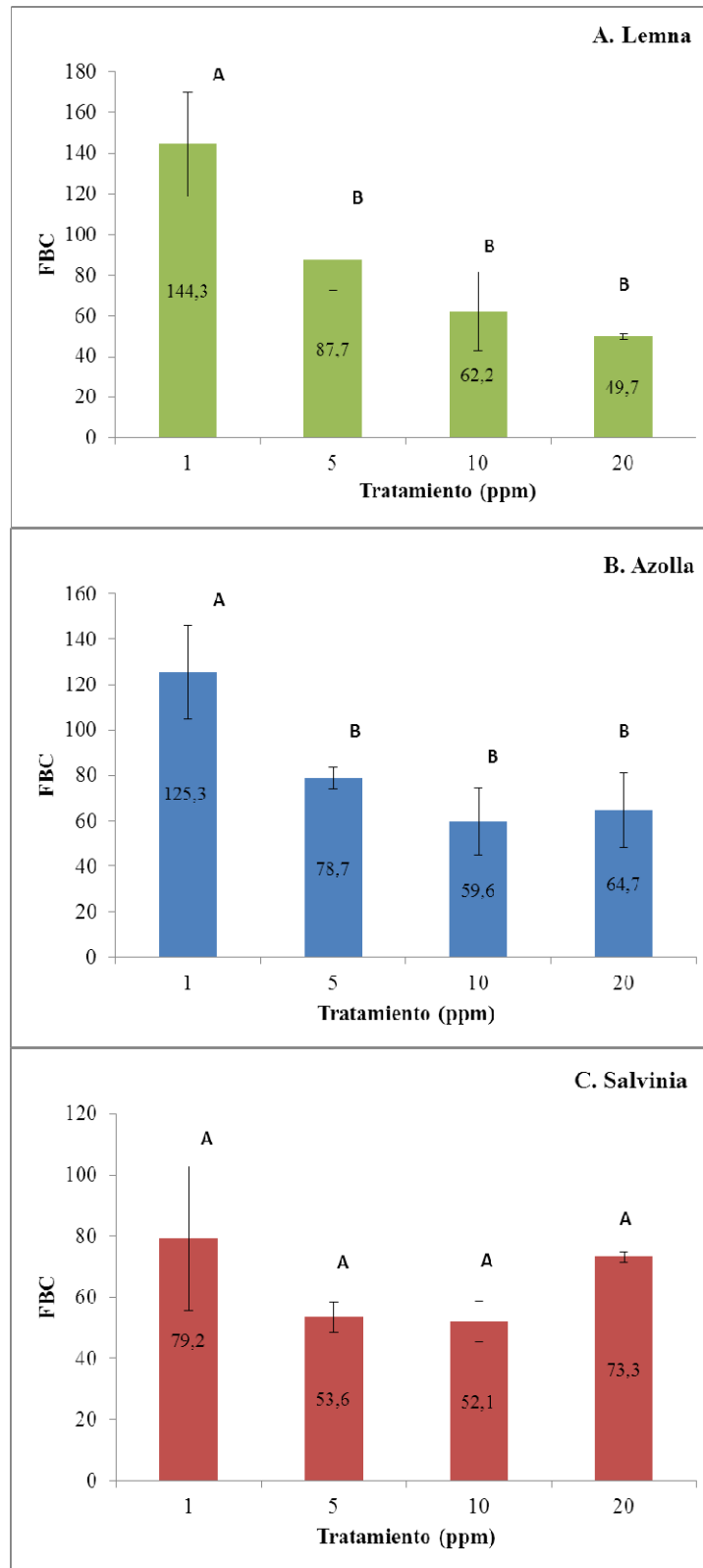


Figura 3. Factor de Bioconcentración (FBC) para cada tratamiento (1, 5, 10, y 20 mg/L). A) *Lemna sp.*, B) *Azolla sp.* y C) *Salvinia sp.* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). El número sobre las barras indica el valor promedio del FBC ($n=3$) para cada tratamiento.

Al analizar el FBC para cada tratamiento, se observó que tanto *Lemna sp.* como *Azolla sp.* presentaron diferencias significativas ($p=0,0006$ y $p=0,0028$, respectivamente) para el tratamiento de 1 ppm mientras que en *Salvinia sp.* no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) para ninguno de los tratamientos (Figura 3). Esto nos indica que tanto *Lemna sp.* como *Azolla sp.* sometidas a una concentración de 1mg/L tendrían una mayor capacidad para bioacumular este metal, respecto a los otros tratamientos ensayados. El decrecimiento del FBC con el aumento de cromo en el medio también fue encontrado por Zayed 1998 y Diwan 2010 para Cr en *Lemna sp.* y en *Brassica juncea*. Los mayores factores de bioconcentración se obtuvieron para la menor concentración de cromo en solución para las tres especies. El máximo valor de FBC (144,3) fue hallado en *Lemna sp.* y corresponde al tratamiento de 1 ppm de Cr T.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron por un lado que la acumulación de cromo en el tejido de estas tres especies aumentó con la dosis del tratamiento y por otro, que presentaron tolerancia aún a elevadas concentraciones (20 mg/L) del metal en solución. No existe evidencia que el cromo resulte indispensable para el crecimiento de las plantas (Zayed & Terry, 2003). Teniendo en cuenta la definición de especie indicadora dada por Ghosh y Singh (2005) podemos explicar que la tolerancia de las plantas a elevadas concentraciones de metales pesados estaría dada por la producción de compuestos intracelulares que quelan a estos elementos disminuyendo su toxicidad, o bien, por la alteración del patrón de compartimentación de los mismos mediante el almacenamiento en partes no sensibles (generalmente en las vacuolas). Por otro lado, el factor de Bioconcentración (FBC) es un parámetro útil para evaluar el potencial de las plantas para la acumulación de metales. En nuestro estudio, este factor dependió de los diferentes niveles de Cr T en solución. El FBC fue máximo para los tratamientos con menor concentración de cromo agregado. El factor fue significativamente mayor en el tratamiento de 1 mg/L, para *Lemna sp.* y *Azolla sp.* En cambio, para *Salvinia sp.*, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. Un FBC estable a través de un rango de concentración significa que la planta puede ser utilizada de manera eficiente para la fitorremediación en un amplio y fluctuante rango de concentraciones de metales pesados (Zurayk 2001).

Debido a su capacidad de bioacumulación de Cr T a concentraciones elevadas así como su FBC estable para las distintas concentraciones de cromo en solución, se continuara el estudio con la

especie *Salvinia sp.* En los próximos ensayos se realizarán tanto estudios cinéticos de remoción como de descomposición con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de exposición así como el de cosecha. De esta manera lo que se pretende es dejar a la planta el tiempo suficiente como para obtener la mayor bioacumulación de cromo antes de que comience el proceso de descomposición y con éste la liberación del metal a la columna de agua.

REFERENCIAS

- Colombo, C. y Pennella, F. 2003. *Protección ambiental en la industria de tratamientos superficiales*. Ed.: Sociedad Alemana para la Cooperación Técnica (GTZ según sus iniciales en alemán) y la Cámara de Industria de Procesos de la República Argentina (CIPRA). I.S.B.N. 987-20598-4-5
- Diwan.H, Ahmad.A, Iqbal. M. 2010. Uptake-related parameters as indices of phytoremediation potential. *Biologia* 65/6: 1004—1011, 2010 Section Botany.
- Ghosh.M y Singh.S.P. 2005. A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of It's by Products. *As. J. Energy Env.* 2005, 6(04), 214-231. ISSN 1513-4121
- Peer, W., Baxter, I., Richards, E., Freeman, J. y Murphy, A. 2005. *Phytoremediation and hyperaccumulator plants*. Topics in Current Genetics, Vol. 14 M.J. Tamás, E. Martinoia (Eds.): Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification
- Peterson,H. y Moody,M. 1997. *Modified APHA Medium for Testing Lemna sp. minor*. Saskatchewan Research Council, Water Quality Section Laboratory.
- Raskyn, I, Smith, R. y Salt, D. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutant from the environment. *Curr Opin Biotechnol* 8, 221-226.
- Zayed.A, Gowthaman.S y Terry. N. 1998. Phytoaccumulation of Trace Elements by Wetland Plants: Duckweed. *Journal of Environmental Quality*; May/Jun 1998; 27,3; ProQuest. Pag 715
- Zayed. A y Terry. N. 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Kluwer Academic Publishers*. Plant and Soil 249: 139–156, 2003.
- Zurayk R., Sukkariyah B., Baalbaki R. & Ghanem D.A. 2001. Chromium phytoaccumulation from solution by selected hydrophytes. *Inter. J. Phytoremed.* 3: 335–350.